

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

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

*На правах рукописи*

*Гузель*

Рыскулова Гузель Мансуровна

ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ  
МИКРООРГАНИЗМОВ, АССОЦИИРУЕМЫХ С ПАТОЛОГИЕЙ  
ПАРОДОНТА

Научный руководитель:  
зав. кафедрой ФПМ,  
доктор медицинских наук,  
профессор

А.Р. Мавзютов

Уфа – 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	8
1.1. Современные представления о воспалительных заболеваниях пародонта	8
1.2. Основные аспекты этиологии и патогенеза воспалительных заболеваний пародонта	9
1.3. Общая характеристика и классификация представителей рода <i>Streptococcus</i>	18
1.4. Описание отдельных представителей рода <i>Streptococcus</i>	25
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	32
2.1. Объекты исследования	32
2.2. Приготовление селективных питательных сред	33
2.3. Условия культивирования микроорганизмов	40
2.4. Описание культуральных свойств выросших колоний	40
2.5. Описание тинкториальных свойств выросших колоний	42
2.6. Выделение бактериальной ДНК из выросших колоний	44
2.7. Проведение ПЦР в режиме реального времени	45
2.8. Проведение MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа выделенных штаммов стрептококков	47
2.9. Метод длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов	49
2.10. Определение антимикробной активности растительных экстрактов	50
2.11. Определение противомикробной активности химических соединений	51
<b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ</b>	53
3.1. Исследование культуральных свойств выросших колоний	53
3.2. Исследование тинкториальных свойств выросших колоний	61
3.3. Проведение MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа	63

выделенных штаммов стрептококков	
3.4. Проведение молекулярно-генетического анализа выделенных штаммов стрептококков	66
3.5. Реализация метода длительного хранения коллекционных культур пародонтопатогенных микроорганизмов	69
3.6. Определение антимикробной активности растительных экстрактов полуколичественным диско-диффузионным методом	70
3.7. Определение противомикробной активности химических соединений полуколичественным диско-диффузионным методом	72
ВЫВОДЫ	85
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	86
ПРИЛОЖЕНИЕ	94

**Список сокращений и условных обозначений**

ВОЗ - Всемирная Организация Здравоохранения

ДМСО - диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗП – заболевания пародонта

ПМН – полиморфноядерные нейтрофилы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

ХГП – хронический генерализованный пародонтит

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** В последние годы повсеместно отмечается увеличение заболеваемости пародонтитом, что представляет собой серьезную проблему, особенно для взрослого населения, у которых частота встречаемости пародонтита достигает 98% случаев (Darby et al., 2005; Грудянов, Фоменко, 2010; Луцкая, 2010; Ramich et al., 2014).

Пародонтит - это инфекционно-воспалительное поражение всего комплекса поддерживающих структур зубов с прогрессирующей деструкцией десны, пародонтальной связки и альвеолярной кости, ведущее к полной утрате зубов (Thiha et al., 2007; Грудянов и др, 2009; Corraini et al., 2012). Развитие этой патологии связывают с формированием микробной биопленки в придесневых областях и межзубных промежутках, где пародонтопатогенные микроорганизмы продуцируют комплекс ферментов, способствующих нарушению целостности эпителиальных тканей, разрушению зубодесневого аппарата, сенсибилизации макроорганизма и изменению иммунореактивности. Прогрессирование обусловленного бактериями воспалительного процесса сопровождается пролиферацией и погружным ростом эпителия, разволокнением и разрушением волокон периода (Fowler et al., 2001; Булкина и др., 2006; Cullinan et al., 2010; Лукиных и др., 2011). Антибиотикотерапия таких процессов недостаточно эффективна, поскольку не обеспечивает нейтрализации уже образовавшихся продуктов микробного происхождения, которые в настоящее время, несмотря на многочисленные публикации, изучены недостаточно (Косенко и др., 2000; Цепов и др., 2005; Зорина и др., 2011; Добрењков и др., 2014; Вечерковская, 2015).

Во многих исследованиях показано, что наиболее часто встречающимися являются пародонтопатогенные виды бактерий *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* и *Treponema*

*denticola* (Maiden et al., 2003; Царев и др., 2004; Чепуркова и др., 2007; Simonson et al., 2012; Haffajee et al., 2014). В то же время охарактеризованы некоторые факторы патогенности, оказывающие наиболее значительный эффект на структурную и функциональную целостность десневого эпителия (Scheres et al., 2010; Царев и др., 2014; Triantafilou et al., 2014). Однако в целом патогенный потенциал пародонтопатогенных микроорганизмов остаётся недостаточно изученным.

Среди многочисленных причин сложившейся ситуации, в качестве одной из основных рассматривают отсутствие коллекций пародонтопатогенных микроорганизмов, являющихся преимущественно облигатно анаэробными и микроаэрофильными бактериями. В этой связи в специальной литературе данные о физиологии, биохимии и генетике этих бактерий немногочисленны и отрывочны. Вместе с тем, комплексная микробиологическая характеристика пародонтопатогенов могла бы оказаться полезной для разработки новых терапевтических подходов, основанных на нейтрализации протеолитических ферментов этих бактерий, для создания новых, эффективных в стоматологии, пре- и пробиотиков и препаратов, повышающих неспецифическую резистентность.

**Цель исследования.** Сформировать коллекцию клинических штаммов микроорганизмов, ассоциируемых с патологией пародонта, для разработки новых способов диагностики и лечения пародонтита.

### **Задачи исследования**

1. Сбор клинического материала из пародонтальных карманов больных хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести.
2. Подбор питательных сред и условий для выделения и культивирования пародонтопатогенных микроорганизмов.
3. Проведение MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа выделенных штаммов бактерий.

4. Проведение молекулярно-генетического анализа выделенных штаммов бактерий.

5. Определение антимикробной активности веществ различной природы с использованием выделенных штаммов пародонтопатогенных микроорганизмов.

### **Практическая значимость**

Впервые будет сформирована коллекция пародонтопатогенных микроорганизмов, имеющих клиническое значение при развитии воспалительных заболеваний пародонта. Будут изучены факторы патогенности пародонтопатогенных микроорганизмов и их роль в развитии патологических состояний.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Современные представления о воспалительных заболеваниях пародонта

Пародонтит – это заболевание воспалительного характера, при котором происходит разрушение тканей, которые окружают и удерживают зуб в зубной лунке – дёсен, периодонта, цемента и альвеолярных отростков. Современная классификация пародонтита (Международная классификация болезней (МКБ-10, 2004)) основана на трех важных моментах — степени тяжести пародонтита, стадии развития заболевания и места его локализации. В зависимости от степени тяжести различают пародонтит легкой, средней и тяжелой формы; в зависимости от стадии развития заболевания различают острый и хронический пародонтит; в зависимости от места локализации заболевания различают местный (локализованный) и общий (генерализованный) пародонтит.

Острый пародонтит в свою очередь классифицируется на пародонтальный абсцесс десневого происхождения без свища и пародонтальный абсцесс десневого происхождения со свищом. Хронический пародонтит делится на локализованный, генерализованный, хронический перикоронит и утолщенный фолликул (гипертрофия сосочка). По степени тяжести пародонтит можно разделить на легкую (пародонтальные карманы не более 4 мм, резорбция костной ткани межкорневой перегородки до 1/3 длины корней, патологической подвижности нет), среднюю (карманы от 4 до 6 мм, резорбция костной ткани перегородок на 1/3-1/2 длины корней, патологическая подвижность I-II ст.) и тяжелую (глубина карманов более 6 мм, резорбция костной ткани перегородок более ½ длины корней, патологическая подвижность II-III ст.) степени.

Являясь полиэтиологическим заболеванием, пародонтит остается проблемой номер один в стоматологии и представляет значительные

трудности в лечении для врачей-клиницистов. Воспалительные заболевания пародонта являются наиболее распространенным заболеванием взрослого населения во всем мире (Dent, 2008; Ikeno, Miyazawa, 2010; Aaltonen, Tenovuo, 2016; Aliasghari et al., 2016). Это подтверждают последние данные ВОЗ, согласно которым распространённость заболеваний пародонта (ЗП) у взрослого населения в мире достигает 98%, при этом в возрастной группе 15-19 лет этот показатель составляет 55-99%. Наибольший процент молодых людей, страдающих болезнями пародонта различной степени тяжести в этой группе, выявлен в Африке (90%) и Юго-Восточной Азии (95%). В Америке доля молодых людей со здоровым пародонтом составляет 18%, а в Европейском регионе — 19-20%.

Интактный пародонт имеют только 12% населения России. У 53% людей отмечены начальные воспалительные явления, а у 12% — поражения средней и тяжёлой степени. Распространённость ЗП среди взрослого населения России (35-44 года) составляет 82%. В Центрально-Европейском, Южно-Европейском и Западно-Сибирском округах здоровый пародонт диагностирован у 15-16% людей, а кровоточивость дёсен соответственно у 25, 13 и 24%. В Уральском регионе эти показатели составляют 11 и 51% соответственно. Во всех округах доля пациентов с глубокими пародонтальными карманами варьирует в пределах 1-4%, что подчеркивает важность разработки эффективных мер профилактики (Demina, 2009; Baca, Castillo, 2013; Balasankar et al., 2015; Conrads et al., 2017).

## **1.2. Основные аспекты этиологии и патогенеза воспалительных заболеваний пародонта**

Пародонтитом можно назвать любой патологический процесс, поражающий пародонт. Большинство воспалительных болезней пародонта

возникают в результате бактериальной инфекции. На состояние пародонта могут влиять многие факторы, но основным этиологическим фактором пародонтологических заболеваний является микрофлора, которая колонизирует на поверхности зуба (бактериальный налет и продукты жизнедеятельности бактерий). На рисунке 1 показано взаимодействие этиологических факторов, которые приводят к развитию болезней пародонта. Большое количество системных расстройств может влиять на состояние пародонта. Однако в настоящее время неизвестны системные заболевания, которые могут вызывать развитие пародонтита в отсутствие бактериального налета. Кроме того, существуют местные факторы, которые, взаимодействуя с бактериальным налетом, приводят к развитию хронического пародонтита. Известны только два фактора, которые могут инициировать патологический процесс в пародонте при отсутствии налета: злокачественные заболевания и первичный окклюзионный травматизм.

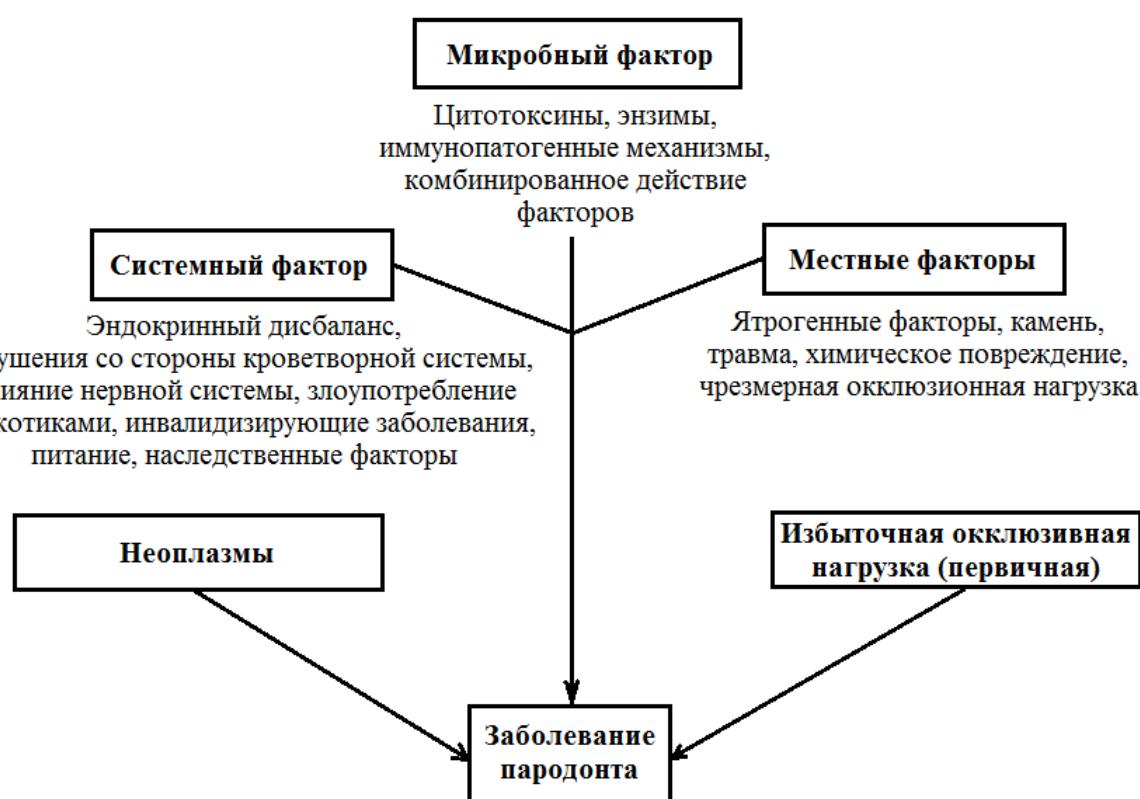


Рисунок 1 – Комплекс факторов, влияющих на состояние тканей пародонта

Для обсуждения роли бактериального налета и его связи с заболеваниями пародонта необходимо определить характер различных материалов, которые аккумулируются на поверхности зуба (МПЗ).

1. Бактериальный налет (микробная бляшка). Существует большое количество видов бактериального налета, однако виды налета, которые приводят к развитию заболеваний пародонта, можно отнести к двум основным категориям. Первый вид представляет собой плотную пленку, состоящую из колоний микроорганизмов, которые растут и прикрепляются к поверхности зуба. Этот вид налета может располагаться как под десной, так и над десной. Второй вид налета - это поддесневой налет, который «свободно плавает» (или слабо прикреплен) между мягкими тканями и поверхностью зуба. Прикрепленный бактериальный налет нельзя удалить направленной струей жидкости, но можно удалить другими механическими средствами. В слабо прикрепленном налете представлены в основном анаэробные бактерии.

2. Прикрепленная пленка. Тонкая (0,1-0,8 микрон) в основном белковая пленка, которая формируется на выступающих зубах и может быть удалена абразивами (например, полировочными пастами). Однако эта пленка быстро образуется вновь. Источником пленки является слюна. Пленка формируется вне зависимости от факта наличия бактерий. Прикрепленная пленка при окраске эритрозином принимает розовый цвет. Красный краситель часто используют для идентификации бактериального налета. Пленку нельзя устраниТЬ ополаскиванием, а ее роль в развитии заболеваний пародонта недостаточно ясна.

3. Камень. Кальцифицированный налет, который обычно покрыт слоем мягкого бактериального налета.

4. Пищевой налет. Остатки пищи в полости рта. Такой налет может быть легко удален действием слюны или мускулатуры полости рта, а также ополаскиванием или с помощью зубной щетки (кроме тех случаев,

когда пища застrevает в межзубных пространствах или пародонтальных карманах).

5. *Materia alba* (белая материя). Мягкая смесь, состоящая из протеинов слюны, некоторых бактерий, большого количества слущенных эпителиоцитов и нескольких разрушенных лейкоцитов. Такая смесь слабо прикрепляется к поверхности зуба, налету и десне. Обычно, белую материю можно смыть струей воды. В настоящее время токсичный потенциал белой материи и ее роль в формировании бактериального налета неизвестны. В таблице 1 представлены некоторые различия между налетом, белой материей и мягким налетом.

Таблица 1 – Некоторые отличия между микробной бляшкой, белой материей и пищевым налетом

<b>Признак</b>	<b>Бляшка</b>	<b>Белая материя</b>	<b>Пищевой налет</b>
Прикрепление	Близкое	Слабое	Нет
Эффект ополаскивания	Нет	Смещается струей воды	Смещается легко
Структура	Определенная	Аморфная	Нет

Данные световой и электронной микроскопии доказывают наличие значительных морфологических отличий между наддесневым и поддесневым бактериальным налетом. Морфология наддесневого налета схожа у пациентов с гингивитом и пародонтитом (Dent, 2008; Demina R. 2009; Ikeno, Miyazawa, 2010; Hoover, Newbrun, 2013; De Stoppelaar, Van Houte, 2015).

Бактериальные клетки плотно расположены на поверхности зуба и могут формировать довольно толстый слой (0,5 мм и более). Состав микробной флоры налета включает кокки и относительно большое количество палочек. Некоторые волокнистые формы бактерий покрыты кокками, образуя «початки кукурузы». Апикально и на внешней поверхности наддесневого налета обнаруживают жгутиконосные формы бактерий и спирохеты.

Поддесневой налет у пациентов с пародонтитом состоит из внутреннего и внешнего слоев. Внутренний слой плотно прикрепленных бактерий непрерывен, но тоньше и менее организован, чем наддесневой налет. Кнаружи от такого плотно прикрепленного слоя и вблизи мягких тканей кармана располагается слабо прикрепленный слой микроорганизмов. Этот слой состоит из большого количества спирохет, грамотрицательных бактерий и бактерий, формирующих группы в виде «ершика».

Виды микроорганизмов, обнаруженных в налете, варьируются не только у различных пациентов, но даже у одного пациента в разных участках полости рта. Прогрессирующий рост бляшки и динамика ее микробного состава в своей основе являются упорядоченным процессом, в то же время отличающимся индивидуальностью. Различают три фазы созревания биопленки (Hirose et al, H., 1993; Leung, Darvell, 1994; Dent, 2008; Klinke, 2011; Balasankar et al., 2015; Fekrazad, Seraj, 2017):

1. Через 48 часов после прекращения чистки зубов происходит пролиферация грамположительных кокков. Формируется бактериальная пленка толщиной менее 1 мм, состоящая преимущественно из кокков.

2. Через 1-4 дня появляются в значительном количестве фузобактерии и филаменты. Состав флоры в этот период (грамположительные и грамотрицательные кокки, филаменты) вызывает гингивит.

3. Через 4-9 дней появляются спирохеты и спириллы. Состав флоры идентичен таковому при пародонтите.

Первичная колонизация осуществляется факультативными анаэробными грампозитивными кокками. Они адсорбируются на поверхности пелликулы за короткое время. 24-часовой налет представлен разными видами стрептококков; *Streptococcus sanguis* является преобладающим видом. На следующем этапе грампозитивные палочки, которые изначально были в меньшинстве, увеличиваются в количестве и

начинают преобладать над стрептококками. *Actinomyces* spp. (*A. naeslundii*, *A. viscosus*, *A. israelii*, *A. odontolyticus*) является преобладающим видом на данном этапе. Поверхностные рецепторы кокков и палочек способствуют адгезии грамотрицательных микроорганизмов (вейллонелл, фузобактерий и других анаэробов), которые не способны присоединиться непосредственно к пелликуле. Таким образом, в зрелой бляшке превалируют грамнегативные облигатно-анаэробные бактерии — бактероиды, фузобактерии, вейллонеллы — и грампозитивные — актиномицеты, микроаэрофильные стрептококки и пептострептококки. Присутствие компонентов крови и десневой жидкости способствует росту грамотрицательной флоры, усиливая ее пародонтопатогенный потенциал.

Характерным признаком длительно существующего зубного налета является присутствие в нем мертвых и лизированных бактерий, которые являются дополнительным источником питания для живых микроорганизмов. Кроме того, принимая сигналы, посылаемые окружающей средой, бактерии способны отделяться от биопленки и формировать колонии на новом месте.

Несмотря на то, что взаимодействие бактерий в составе налета всегда является достаточно сложным механизмом, а существующие в настоящее время микробиологические методы представляют далеко не точную информацию о составе микробного налета, были выделены преимущественные микробные представители и их сочетания.

Классификация пародонтальных микробных комплексов (Franco, Amoroso, 2009; Hirose, Hirose, 2009; Ikeno, Miyazawa, 2010; Hoover, Newbrun, 2013; Rowan, Straffon, 2016).

Красный комплекс включает пародонтопатогенные виды: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* и *Treponema denticola*. Присутствие бактерий данного комплекса в тканях пародонта обусловливает наличие следующих симптомов: болезненность и кровоточивость десен, наличие гнойного экссудата, выраженные

деструктивные процессы. Высокая степень патогенности данных микроорганизмов обусловлена наличием факторов вирулентности - протеаз и гемагглютинина, способствующих активному внедрению и размножению микробов в ткани с последующим её разрушением.

Оранжевый комплекс обладает высокой патогенностью и представлен: *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Eubacterium nodatum*, *Peptostreptococcus micros*. Продуцируя эндотоксины и различные виды энзимов, бактерии данного комплекса способствуют нарушению целостности мембран эпителиальных клеток и разрушению периодонтальной ткани. Также в ходе обмена веществ, пародонтопатогены производят метаболиты, необходимые для выживания более требовательных микроорганизмов красного комплекса.

Зеленый комплекс представляет собой сочетание пародонтопатогенов: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga spp.*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens*. Данные микроорганизмы являются ранними колонизаторами зубодесневых карманов и именно их совместное заселение может привести к развитию ювенильных и агрессивных форм пародонтита, а также к различного рода воспалительным заболеваниям слизистой оболочки полости рта. Очень высокая степень патогенности обусловлена способностью производить фосфатазы, цитотоксин, лейкотоксин, оказывая иммуноподавляющее действие на организм.

Микроорганизмы, входящие в пурпурный (*Actinomyces odontolyticus*, *Veillonella parvulla*) и желтый (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus israelii*, *Streptococcus sanguis*) пародонтальные комплексы являются представителями нормальной микрофлоры полости рта и в то же время предикторами прогрессирования заболевания. Это связано с интенсивным ростом и размножением бактерий в пародонтальных карманах при развитии воспалительных процессов.

Выделение этих комплексов не означает, что в их состав входят только перечисленные виды микроорганизмов, однако именно эти представители микробных сообществ являются биомаркерами текущей активности и прогрессирования заболевания.

Хотя колонизирующие микроорганизмы являются основным компонентом бляшки, при проведении фазово-контрастной микроскопии могут быть выявлены и другие составляющие зубного налета.

1. Эпителиальные клетки. Обнаружаются почти во всех пробах бактериальной бляшки на различных этапах развития. Они могут варьироваться от недавно опущенных клеток с четкими ядрами и организованными клеточными стенками до того, что можно назвать «призраками» или «теньями» клеток, кишащими бактериями.

2. Белые клетки крови. Лейкоциты, чаще полиморфноядерные нейтрофилы (ПМН), с различной жизнеспособностью могут быть обнаружены на некоторых стадиях воспаления. Интересно, что живые лейкоциты могут присутствовать и при наличии клинически здоровой десны. В цитоплазме гранулоцитов могут находиться микроорганизмы. В участках с выраженной экссудацией и гноетечением среди большого количества гранулоцитов часто бывает трудно выявить какие бы то ни было живые клетки.

3. Эритроциты. Обычно обнаруживают в пробах, полученных с поверхностей зубов, которые прилегают к изъязвленной десне.

4. Простейшие. В бляшке, прилегающей к участкам с острым гингивитом или расположенной в пародонтальных карманах, часто обнаруживают представителей некоторых родов простейших, чаще *Entamoeba* и *Trichomonas*.

5. Частицы пищи. Время от времени в пробах бляшки могут быть обнаружены остатки пищи. Чаще они представлены мышечными волокнами, узнаваемыми по характерной исчерченности.

6. Другие компоненты. В бактериальной бляшке можно обнаружить неспецифические элементы, например, кристаллоподобные частицы (возможно, фрагменты цемента, начинающаяся кальцификация или неопределенные пищевые включения), а также фрагменты клеток.

В качестве механизмов действия бактерий принято рассматривать следующие процессы:

1. Инвазия. Бактериальная инвазия не является обязательным условием развития воспаления десны. Необходимо лишь достаточное количество бактерий (возможно специфичных патогенных бактерий), прикрепленных к зубу рядом с десной в течение длительного периода времени, это приводит к раздражению тканей токсичными продуктами жизнедеятельности микроорганизмов. Не выявлено специфичных микроорганизмов или их групп, которые приводят к «прорыву» пародонта, однако обнаружена связь между некоторыми видами бактерий и стадиями пародонтита. Существуют данные, доказывающие возможность бактериальной инвазии в соединительную ткань.

2. Цитотоксины. Эндотоксины, представляющие собой липополисахариды клеточной стенки грамотрицательных бактерий, могут приводить к некрозу тканей, а также инициировать развитие воспаления посредством активации иммунного ответа и системы комплемента. Кроме того, исследования *in vitro* показали, что эндотоксины некоторых бактерий вызывают резорбцию кости.

3. Энзимы (ферменты).

1) Коллагеназа разрушает (деполимеризует) коллагеновые волокна, которые являются основными формирующими структурами десны и пародонтальной связки. Интересно, что лейкоциты тоже продуцируют коллагеназу и присутствуют в поврежденных тканях на ранних стадиях гингивита.

2) Гиалуронидаза гидролизует гиалуроновую кислоту, которая является важным связывающим ткани полисахаридом. Гиалуронидаза

может играть роль фактора, увеличивающего проницаемость тканей. Этот фермент продуцируют как бактерии, так и клетки организма-хозяина.

3) Хондроитиназа гидролизует сульфат хондроитина, еще одного связывающего ткани полисахарида.

4) Протеазы - группа ферментов, которые разрушают неколлагеновые белки и приводят к увеличению проницаемости капилляров.

4. Иммунопатогенез. Исследования показали, что некоторые антигены бляшки способны вызывать развитие воспаления у животных посредством активации иммунного ответа. У пациентов с пародонтитом развивается и гуморальная, и клеточная иммунная реакция. Роль иммунного ответа при заболеваниях пародонта еще не полностью изучена, однако очевиден его разрушающий потенциал.

5. Комбинированное воздействие. Вероятно, при развитии и прогрессировании воспалительных заболеваний пародонта имеют значение несколько механизмов. Например, известно, что бактериальные энзимы и/или цитотоксичные субстанции могут непосредственно воздействовать на ткани, прилегающие к бороздке, и инициируют опосредованный иммунопатологический ответ.

Точный механизм действия бактериальной бляшки остается неясным, однако не подвергается сомнению и то, что бактерии являются основным этиологическим фактором воспалительных заболеваний пародонта.

### **1.3. Общая характеристика и классификация представителей рода *Streptococcus***

В настоящее время к стрептококкам, выделенным более столетия назад в отдельный род относят большую группу микроорганизмов, характеризующихся рядом общих признаков. Это сферические или

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

В последнем руководстве по определению бактерий (Ikeno, Miyazawa, 2010; Hoover, Newbrun, 2013; Loesche, 2014 Balasankar et al., 2015; Miura, Ueda, 2016) род *Streptococcus* входит в группу 17 «Грамположительные кокки». При определении вида у стрептококков используют в основном нумерические, хемотаксономические и молекулярно-биологические характеристики. Хотя серологические методы остаются важными для идентификации и типирования большинства патогенных микроорганизмов, они не могут быть ведущими для выявления основных таксономических связей между стрептококками из-за возможности межвидового переноса генов.

Специалисты разной ориентации (общие микробиологи, клинические микробиологи, молекулярные биологи, эпидемиологи и др.) для решения своих задач предложили несколько классификаций стрептококков. Самой первой из них была фенотипическая, предложенная в начале XX века Н. Shottmuller, который использовал кровяной агар для дифференциации штаммов, обладающих и не обладающих гемолитическими свойствами. В последующем в соответствии с характером роста на агаре с кровью были выделены 3 группы стрептококков: I α-гемолитические (*S. haemolyticus*), вызывающие гемолиз эритроцитов с формированием вокруг колоний прозрачной обесцвеченной зоны, ширина которой значительно варьирует; II — β-зеленящие стрептококки (*S. viridans*), образующие вокруг колоний ореол серовато-зеленого цвета за счет разрушения эритроцитов.

III  $\gamma$ -негемолитические (*S. anhaemolyticus*), не образующие гемолиз вокруг колоний.

В 1937 г. J. M. Sherman предложил схему, согласно которой известные стрептококки были разделены на четыре категории на основании гемолитической активности, содержания определенных углеводных антигенов, фенотипических характеристик. Соответственно были выделены пиогенные, зеленящие, а также молочнокислые стрептококки и энтерококки. В группу пиогенных стрептококков были включены штаммы, обладающие  $\beta$ -гемолитической активностью серогрупп A, B, C, F и G. Эта группировка стрептококков существенно не отличается от имеющейся в настоящее время системы идентификации, основанной на серогруппировании. Зеленящие стрептококки, включали виды стрептококков, которые не обладали  $\beta$ -гемолитической активностью, не росли при высоких значениях pH и 10°C и в присутствии высокой концентрации соли. В группу молочнокислых стрептококков вошли микроорганизмы, которые были изолированы на предприятиях по изготовлению продуктов из молока. Данная группа отличалась от стрептококков пиогенной группы по гемолитической активности, способности расти при 10°C (но не 45°C), стрептококки этой группы не росли в бульоне в присутствии 6,5 % NaCl. Такие микроорганизмы в 1980 г. были отнесены к роду *Lactococcus*. Виды *Lactococcus*, недавно выделенные из клинического материала, по фенотипическим характеристикам отличаются от лактококков, описанных J. M. Sherman. В четвертую группу Sherman помещены 4 известных в настоящее время вида энтерококков. Хотя некоторые из энтерококков были  $\beta$ -гемолитическими, по способности расти при высоких показателях pH, концентрации солей и в широком диапазоне температур (10-45°C) они отличались от других трех групп стрептококков (Klinke, 2011; Lakshmi, Aravindkumar, 2012; Loesche, 2014; Rowan, Straffon, 2016).

К числу фенотипических классификации можно условно отнести и классификацию (группировку), приведенную в руководстве по определению бактерий Берджи (1997). В нем 38 видов рода *Streptococcus* разделены на 4 группы, выделенные по разным критериям. Ниже представлена их краткая характеристика.

1. «Пиогенные». Эта группа выделена с учетом особенностей развития инфекционного процесса. Она включает имеющие преимущественно медицинское и ветеринарное значение виды стрептококков. Стрептококки этой группы вызывают β-гемолиз на агаре с кровью. Следует иметь в виду, что при анализе большой выборки отдельные штаммы пиогенных видов стрептококков вызывают α-гемолиз или не обладают гемолитическими свойствами, а некоторые штаммы других групп стрептококков также могут вызывать пиогенные инфекции у человека и животных, формировать зоны α- или β-гемолиза, или являются негемолитическими.

2 «Оральные». В эту группу входят *S. adjacens*, *S. cricetus*, *S. defecticus*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. gordonii*, *S. macacae*, *S. milleri*, *S. oralis*. Виды стрептококков этой группы выделены по критерию локализации (преимущественно в слизистой оболочке рта и верхних дыхательных путях человека и животных). Объединение этих видов стрептококков в одну группу не означает, что по таксономическому критерию они более близки друг к другу, чем к другим видам стрептококков.

*S. oralis*, *S. sangius*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. anginosus*, *S. constellatus* и *S. defectivus* утилизируют сиаловую кислоту. Это свойство считают важным фактором вирулентности стрептококков, способствующим развитию инфекционного процесса вне полости рта (Nurelhuda, Al-Haroni, 2010; Shimazaki et al., 2012; Loesche, 2014; Miura, Ueda, 2016; Rowan, Straffon, 2016).

Главным обитателем полости рта детей в возрасте 2 - 24 мес является *S. mitis biovar 2*. В то же время *S. salivarius* и *S. mitis biovar 2*

доминируют и полости рта у детей первого года жизни, а распространенность *S. oralis* и *S. sangius* не велика в течение этого периода жизни. После года превалирующими являлись стрептококки *S. salivarius*.

3. «Анаэробные». Группа сформирована по особенности энергетического метаболизма. Стрептококки этой группы состоят из трех строго анаэробных видов (*S. hansenii*, *S. pleomorphus*, *S. parvulus*) и одного аэротolerантного вида (*S. morbillorum*). Два других аэро- толерантных вида (*S. intermediate*, *S. constellatus*), прежде отнесенные к анаэробным стрептококкам, включены в группу *S. milleri*. Эти анаэробные (микроанаэробные) кокки помещены в род *Streptococcus* из-за их способности образовывать молочную кислоту в качестве основного конечного продукта ферментации. До недавнего времени *S. parvulus* был классифицирован как *Peptostreptococcus parvulus*, но с учетом биохимической активности был перенесен в род *Streptococcus*. При сравнительном изучении данных сиквенса рРНК, ГЦ-состава и типа пептидогликана *S. hansenii*, *S. morbillorum* и *S. pleomorphus* установлено, что ни один из этих видов анаэробных стрептококков не имеет близкого филогенетического родства со стрептококками, энтерококками или лактококками. *S. hansenii* и *S. pleomorphus* более тесно связаны с некоторыми клостридиями. Поскольку по ДНК/ДНК, рРНК-гибридизации, физиологическим свойствам и данным хемотаксономических и биохимических исследований *S. morbillorum* и *G. haemoliticus* сходны, высказано предложение о целесообразности переноса *S. morbillorum* в род *Gemella*. Не исключено, что в последующем, при более детальном изучении связи анаэробных стрептококков между собой и с другими стрептококками, их таксономия и номенклатура будут официально изменены.

4. «Другие». Нет единого критерия при выделении этой группы стрептококков. В нее входят *S. acidominimus*, *S. alactolyticus*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. hyointestinalis*, *S. termophilus*, *S. uberis*.

В 1978 г. В.Д. Беляков и соавт. предложили первую экологическую, точнее смешанную (с учетом патогенности), классификацию стрептококков. Она основана на то, что по экологическому критерию все возбудители инфекционных болезней могут быть разделены на четыре группы (облигатные патогенные паразиты человека; облигатные паразиты животных, патогенные для человека; факультативные паразиты человека и животных; облигатные непатогенные паразиты человека и животных). В то время считалось, что микроорганизмы третьей и четвертой групп являются условно-патогенными. В соответствии с этим все известные к тому времени стрептококки были разделены на следующие 5 биолого-экологические группы (таблица 2) (Nurelhuda, Al-Haroni, 2010; Miura, Ueda, 2016): облигатные паразиты человека, для которых животные являются дополнительной средой обитания, облигатные паразиты многих видов животных, паразиты животных, способные паразитировать на человеке, стрептококки, экология которых изучена недостаточно.

Таблица 2 - Экологическая классификация стрептококков

Группа	Экологическая группа	Представитель стрептококков
1	Антропонозная	<i>S. australis, S.milleri, S.anginosus, S.cristatus, S.constellatus, S.gordonii, S.lutetiensis, S.bovis, S.lutetiensis, S.infantis, S.mitidis, S.mutant, S.oralis, S.parasanguis, S.peroris, S.pyogenes, S.sanguis, S.sinensis, S.sorbinus, S.urinalis, S.vestibularis</i> и др.
2	Антропозоонозная	<i>S.agalactiae, S.mitior, S.pneumoniae, S.pseudopneumoniae, S.salivars.</i>
3	Облигатные паразиты животных	<i>S.acidomimicus, S.alactolyticus, S.entericus, S.didelphis, S.downei, S.equinus, S.entericus, S.ferus, S.macacae, S.orisratti, S.ovis, S.paruberis, S.phocae, S.uberis</i> и др.
4	Зооантропоноз (зооноз)	<i>S.bovis, S.canis, S.caprinus, S.criceti, S.iniae, S.pleomorphus, S.porcinus, S.rattus, S.suis</i> и др.
5	Не определена	<i>S.thermophilus, S.macedonicus.</i>

В полости рта среди представителей нормальной микрофлоры доминируют стрептококки, составляющие до половины ее состава. Их смело можно отнести к аутохтонным микроорганизмам. Некоторые из видов стрептококков полости рта имеют узкую нишу обитания *S. mitior* обитает преимущественно на эпигелии щек, *S. salivarius* - на сосочках языка, *S. sangius* и *S. mutans* на поверхности зубов, α- и γ-гемолитические стрептококки — на коже, пиогенные стрептококки и пневмококки — в верхних дыхательных путях, *S. agalactiae* - преимущественно на слизистой оболочке влагалища беременных женщин, *S. bovis* — в кишечнике (Hayashi, Okada, 2015; Kudryasheva et al. 2016; Zago et al., 2017).

Нередко зеленящие стрептококки называют комменсальными микроорганизмами, поскольку они входят в состав норме флоры здоровых людей, а также паразитами, способными при определенных условиях вызывать у человека различные патологические состояния. Такой «дуализм» микроорганизмов всегда проявляется при обитании на гетерогенных по биологическим свойствам (иммунному статусу) популяциях хозяина или в результате приобретения дополнительных факторов вирулентности от сочленов микробиоценоза.

В руководстве Bergey по систематике бактерий (1984) стрептококки включены в секцию 12 (грамположительные кокки), семейство *Streptococcaceae*, состоящее из 5 родов. При этом выявлена неоднородность рода *Streptococcus* по ДНК/рРНК- гибридизации. С учетом ранее полученных данных о ДНК/ДНК- гибридизациями внутри *S. mutant group* выделено 5 самостоятельных видов. Кроме того, стрептококки серогрупп E, P, U и V, главным образом изолируемые от свиней выделены в новый вид – *S. porcinus*. Ко времени издания руководства осталось еще много неопределенного в классификации стрептококков. Прежде всего это казалось *S. mitis*, *S. mitior*, а также *S. milleri group*. Кроме того, представлялось спорным включением в род стрептококков и

некоторых облигатных анаэробных видов, преимущественно сделанное из-за их способности образовывать из глюкозы молочную кислоту.

К 1995 г. в научной литературе устоялось представление о существовании 34 видов стрептококков. В 1994 г. были определены параметры ДНК/ДНК-гибридизации и 16S рРНК сиквенса в интересах выявления филогенетических связей бактериальных видов (Shimazaki et al., 2012; Pushparaj, Raubbin, 2014; Balasankar et al., 2015). Эти разработки использовались для определения филогенетических связей среди представителей рода *Streptococcus* (рисунок 1) (Niu et al., 2009; Oho, Yamashita, 2012; Zago et al., 2017). В результате составлено филогенетическое древо 34 видов стрептококков. В нем выделено 6 групп: *Mitis*, *Anginosus*, *Salivarius*, *Bovis*, *Mutans*, *Pyogenic* и еще три вида (*S.acidominimus*, *S.suis* и *S.pleomorphus*), которые не вошли ни в одну из перечисленных групп.

#### **1.4. Описание отдельных представителей рода *Streptococcus***

##### **I. *Streptococcus mutans***

Четко очерченный вид стрептококков. На агаре с кровью обычно проявляют  $\alpha$ - или  $\gamma$ -гемолиз, редкие штаммы являются  $\beta$ -гемолитическим. Большинство штаммов образуют кислоту из маннита, сорбита, раффинозы, лактозы, инулина, салицина, маннозы и трегалозы, но не арабинозы, ксилозы, глицерина или мелизитоны. Не образуют аммиак из аргинина, гидролизуют эскулин, но не гиппурат или желатину.

*S.mutans* синтезирует из сахарозы несколько внеклеточных полисахаридов, которые относят к важным факторам колонизации поверхности зубов. У некоторых штаммов выявлены бактериофаги и бактериоцины, которые ингибируют рост грамположительных бактерий.

*S.mutans* преимущественно обитает на поверхности зубов людей, выделяется из фекалий. Обладает способностью ферментировать широкий

круг углеводов с образованием кислоты, которая вызывает деминерализацию эмали зубов и облегчает развитие кариеса. Колонизации зубов способствует высокое содержание в диете сахарозы. У штаммов, выделяемых из полости рта людей, выявлены три серотипа *S.mutans* (c, e и f). Сероспецифичные полисахаридные антигены представляют собой основу полирамнозного скелета, идентичного для рамнозоглюкозного полисахаридного антигена *S.sorbinus*, и группоспецифичный полисахарид серогрупп А, С или Е стрептококков. Молекулярно-биологическими методами установлено, что в действительности этот вид стрептококков более сложный (выявлено 4 риботопа *S.mutans*), чем считалось ранее (Okada, Kawamura, 2012; Kudryasheva et al. 2016). Типовые штаммы — ATCC 25175, DSM 20523, IFO 13955, NCDO 2062, NC10 10449.

### *II. Streptococcus oralis.*

Первоначально по фенотипическим признакам этот вид стрептококков был выделен в отдельный гетерогенный кластер, трудно отличимый от других стрептококков полости рта. В последующем оказалось (Soni, Vasavada, 2007; Soda, Hayashi, 2011; Okada, Kawamura, 2012), что стрептококки, идентифицированные как *S.oralis*, синтезируют внеклеточный полисахарид, обладают нейраминидазной и IgA1 – протеазной активностью, гидролизуют аргинин, эскулин и ферментируют инулин. В ДНК/ДНК-гибридизации выявлена высокая степень родства этой группы штаммов и установлено, что ранее в *S.oralis* были включены отдельные штаммы, принадлежащие к *S.mitior* и *S.sanguis*.

*S.oralis* изолируется из полости рта человека. Типовые штаммы — ATCC 35037, DSM 20627, LVG 1, NCTC 11427, PB 182.

### *III. Streptococcus salivarius.*

Эти стрептококки формируют отдельный гомогенный кластер, удаленный от других видов стрептококков, обитающих в полости рта. С помощью ДНК/рРНК-гибридизации *S.salivarius* и *S.thermophilus* установлено, что эти виды не только тесно связаны между собой, но

близкородственны также с *S.bovis* и *S.equinus*. В ДНК/ДНК-гибридизации гомология *S.salivarius* и *S.thermophilus* составляла 75-97%, что отдельным авторам позволило рассматривать *S.thermophilus* как подвид *S.salivarius*. Однако поскольку нумерические таксономические исследования противоречили такому заключению, принято решение о выделении *S.thermophilus* в самостоятельный вид.

Большинство штаммов *S.salivarius* на агаре с кровью не способны к гемолизу, α- и β-гемолитические варианты выявляются редко. На плотных питательных средах стрептококки растут в виде гладких и шероховатых колоний; при пересевах в бульоне шероховатые варианты часто ревертируют в гладкие формы. На сахарозном агаре большинство колоний образуют растворимый фруктан (леван), в результате чего наблюдается формирование мукоидных колоний. Некоторые штаммы синтезируют также нерастворимые глюканы (декстраны). На агаре с сахарозой формируют гладкие или шероховатые колонии, что зависит от соотношения внеклеточных полисахаридов, синтезируемых микроорганизмами.

Конечный pH в бульоне с глюкозой 4,0-4,4. Кислота образуется из глюкозы, сахарозы, мальтозы, раффинозы, инулина, салицина, сорбита, ксилозы и лактозы, но не глицерина, маннита, сорбита, ксилозы или арабинозы. Большинство штаммов гидролизуют эскулин и мочевину, но не аргинин.

Штаммы *S.salivarius* серовара I обычно реагируют с групповой сывороткой K и перекрестно – с сывороткой против *S.anginosus* или *S.milleri*. Штаммы *S.salivarius* типа II не реагируют ни с одной из этих сывороток. Приблизительно 50% штаммов *S.salivarius* клинического происхождения агглютинируются групповой сывороткой K (Soda, Hayashi, 2011; Okada, Kawamura, 2012; Vaezifar, Rahimi, 2015).

*S.salivarius* выделяется от человека и животных. Эти стрептококки особенно часто обнаруживаются при анализе микрофлоры языка, слюны,

фекалий человека. Редко выделяются из крови при эндокардитах инфекционных этиологий. Типовые штаммы — ATCC 7073, DSM 20560, NCTC 8618.

#### IV. *Streptococcus sanguis*.

В ДНК/ДНК-гибридизации выявлены две группы, проявляющие 85-100% внутригрупповой и 40-60% межгрупповой гомологии. Первоначально из-за отсутствия фенотипических различий большинство специалистов не поддержали предложение о выделении в этом виде двух подвидов (*subs. sanguis* и *subs. coryniformis*). В последующем на основании фенотипических характеристик выявлено два кластера стрептококков, получивших самостоятельные видовые наименования: *S.sanguis* и *S.gordonii*. В первом из них (*S.sanguis*) по биохимическим и серологическим свойствам выделены четыре биовара. Типовой штамм, отнесенный к 1-му биовару РУ, потерял способность ферментировать несколько углеводов, обычно расщепляемых этим видом. Биовар 4 обладал уникальным типом IgA1 протеазы. Высказано мнение, что он может быть выделен в отдельный вид стрептококков (Nurelhuda, Al-Haroni, 2010; Mayer, Pontes, 2011; Miura, Ueda, 2016). Большинство штаммов проявляют α-гемолиз, лучше выявляемый при выращивании стрептококков в аэробных условиях, отдельные штаммы не обладают гемолитической активностью или являются β-гемолитическим. Конечный pH при выращивании в бульоне с глюкозой 4,6-5,2. Кислота образуется из глюкозы, мальтозы, сахарозы, салицина и обычно из трегалозы. Арабиноза, ксилоза, глицерин и маннит обычно не ферментируются. *S.sanguis* постоянно выделяется из зубных отложений, где эти стрептококки преобладают, реже они высеваются из слюны, слизи глотки. У детей они впервые выявляются в полости рта после прорезывания первых зубов. При бактериальных эндокардитах высеваются из крови, с поверхности клапанов сердца. В низкой концентрации высеваются из фекалий человека. Типовые штаммы — ATCC 105%, DSM 20567.

### V. *Streptococcus sobrinus*.

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

VI. *Streptococcus macasae*. Этот вид стрептококков отличается от других, обитающих в полости рта видов стрептококков тем, что образует кислоту из маннита и раффинозы, но не инсулина или декстрина. *S.macasae* не способны расти в присутствии бацитрацина, не образуют перекись водорода, не гидролизуют аргинин, расщепляют эскулин. Синтезируют декстран из сахарозы.

*S.macasae*, как *S.mutans* и *S.ferus*, обладает с антигеном, однако отличается от них, равно и от других стрептококков, по ГЦ-составу и профилю белков при электрофорезе в полиакриламидном геле.

*S.macasae* образует кислоту из N-ацетилглюкозамина, амигдалина, целлобиозы, фруктозы, глюкозы, галактозы, мальтозы, сахарозы и трегалозы. Конечный pH в бульоне с сахарозой 4,6-4,9. Адонит, арабиноза, глицерин, инозит, мелезитоза, мелибиоза, ксилит и ксилоза не ферментируется. Каталаза отсутствует, перекись водорода не образуется. Аргинин не гидролизуется.

*S. macasae* особенно часто обнаруживаются при анализе микрофлоры языка, слюны, фекалий человека. Типовые штаммы – 25-1, ATCC 35911, DSM 20724, NCTC 11558.

Все вышеперечисленные виды стрептококков относятся к одной большой группе зеленящих стрептококков, которые можно идентифицировать, опираясь на биохимические свойства, представленные в таблице 3.

Таблица 3 - Идентификация большой группы зеленящих видов стрептококков (R.Facklam, 2002)

Группа, вид	Аргинин	Эскулин	Фогес-Проскауэр	Маннит	Сорбит	Мочевина
<i>S.anginosus</i>	+	+	+	-	-	-
<i>S.constellatus</i>	+	+	+	-	-	-
<i>S.intermedius</i>	+	+	+	-	-	-
<i>Sanguinus group</i>						
<i>S.sanguins</i>	+	+	-	-	V	-
<i>S.parasanguinis</i>	+	V	-	-	-	-
<i>S.gordonii</i>	+	+	-	-	V	-
<i>Mitis group</i>						
<i>S.mitis</i>	-	-	-	-	V	-
<i>S.oralis</i>	-	V	-	-	-	-
<i>S.cristatus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>S.infantis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S.perois</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S.orisratti</i>	-	+	-	-	-	-

Примечание: «+» - положительная реакция у >92% штаммов;  
 «-» - положительная реакция у <8% штаммов; V – вариабельная положительная реакция у 8-91% штаммов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объекты исследования

В исследование были включены 32 пациента с хроническим генерализованным пародонтитом средней степени (11 мужчин и 21 женщина) в возрасте от 32 до 72 лет. По данным анамнеза продолжительность заболевания у пациентов составляла от нескольких месяцев до 15 лет.

Критериями включения в исследование являлись: установление у пациента ХГП средней степени тяжести, без наличия фоновой патологии или с таковой. Все пациенты, включенные в исследование, в полном объеме и в доступной форме были проинформированы о проводимых методах обследования. Каждым участником исследования было подписано добровольное информированное согласие на участие в нем.

Пациентам был проведен стандартный стоматологический осмотр с определением формы и степени поражения, характеризующиеся воспалением и деструкцией тканей пародонта, экссудацией из пародонтального кармана, кровоточивостью десен при чистке зубов. Для объективной оценки клинического состояния пародонта учитывались гигиенические индексы: индекс Грина-Вермиллиона (OHI-S, Green-Vermillion, 1964), индекс PMA (Schour, Massler, 1948; Massler, 1967), индекс CPITN (ВООЗ, 1989).

Материал для микробиологического исследования - содержимое пародонтального кармана зубов. Содержимое пародонтального кармана отбирали сразу несколькими способами:

1. стерильным бумажным эндодонтическим штифтом (размер №25), который вводили пинцетом в пародонтальный карман в наиболее глубокие участки на 10 секунд и затем помещали в стерильную пластиковую пробирку типа Eppendorf (1,5 мл), содержащую 1 мл физиологического раствора;

2. зондом-тампоном с транспортной средой Эймса (имеет в своем составе тиогликолят натрия, хлорид кальция, неорганический фосфатный буфер, а также соли кальция, магния, калия и натрия, pH среды 7.3; неорганический фосфат снижает скорость роста некоторых энтеробактерий (*Escherichia* spp., *Klebsiella* spp.), что позволяет другим патогенным бактериям (*Salmonella* spp., *Shigella* spp.) эффективно сохраняться в этой среде);

3. зондом-тампоном с транспортной средой Стюарта с добавлением активированного угля (представляет собой бедный питательными веществами субстрат, содержащий тиогликолят натрия, хлорид кальция и глицерофосфат натрия, pH среды 7.4; низкий редокс-потенциал среды обеспечивает замедление обменных процессов у микроорганизмов, что способствует их лучшему сохранению; глицерофосфат способствует размножению некоторых энтеробактерий (*Escherichia* spp., *Klebsiella* spp.)). Активированный уголь применяется для нейтрализации токсичных для бактериальных клеток метаболитов, выделяемых ими в среду.

После взятия биологического материала зонд-тампон погружали в полужидкий агаровый столбик пробирки. Микроорганизмы хранились в данных средах от 12 до 72 часов при + 2-8°C. После транспортировки в лабораторию они асептично пересевались на обогащенные среды, а затем на специализированные для каждого микроорганизма среды.

## **2.2. Приготовление селективных питательных сред**

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

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

- Состав среды:

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

- Ход приготовления питательной среды:

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

- Культивирование в течение 18-24 ч при 35-37°C.
- Принцип и оценка результата:

Папаиновый перевар соевой муки, гидролизат казеина, соли и глюкоза служат источником необходимых питательных веществ для роста стрептококков. Азид и сульфит натрия подавляют рост грамположительных палочек, а кристаллический фиолетовый – рост стафилококков. Вместе с тем указанные ингибиторы в данных концентрациях не подавляют рост стрептококков, именно поэтому нами были использованы именно эти среды для выделения и культивирования стрептококков. Также на этой среде активно подавляется рост колiformных бактерий, протеев, псевдомонад и бацилл, но некоторые стафилококки и пневмококки могут давать на ней рост. Все колонии стрептококков, выросшие на данной среде, отправлялись на дальнейшую идентификацию.

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

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

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

- Ход приготовления питательной среды:

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

- Культивирование в течение 18-48 ч при 35-37°C.
- Принцип и оценка результата:

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

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

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

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

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

- Ход приготовления питательной среды:

Размешивали 44,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды. Кипятили для полного растворения частиц. Стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин. Остужали до 40-50°C и асептично вносили стерильную дефибринированную кровь барана (до 5% об/об).

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

Присутствие специального пептона обеспечивает быстрый и обильный рост на ней даже прихотливых микроорганизмов. Кроме того, на ней

вырастают типичные колонии, лучше проявляется пигментообразование и более четкие гемолитические реакции.

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

#### 4) Агар Мюллера-Хинтона (Mueller Hinton Agar, «HiMedia», Индия).

- Применение: для культивирования нейссерий и для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным средствам.
- Состав среды:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Мясной настой	300,00
Гидролизат казеина	17,50
Крахмал	1,50
Агар-агар	17,00
Конечное значение pH (при 25°C)	7,3 ± 0,2

- Ход приготовления питательной среды:

Размешивали 38,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды. Кипятили для полного растворения частиц. Стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин. Тщательно перемешивали и разливали в стерильные чашки Петри.

- Культивирование в течение 18-24 ч при 37°C.
- Принцип и оценка результата:

Гидролизат казеина и мясной настой источником углерода, азота, серы, витаминов и других важных факторов для роста микроорганизмов. Крахмал выступает в роли защитного коллоида, нейтрализующего токсические вещества, образуемые в среде при культивировании.

Гонококки и менингококки растут на этой среде очень хорошо. Ввиду высокой воспроизводимости результатов агар Мюллера-Хинтона рекомендован экспертами ВОЗ для проведения тестов антибиотикочувствительности микроорганизмов.

5) Среда АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала).

- Применение: для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.
- Состав среды:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Основа питательная для АГВ сухая	41,0
Крахмал растворимый	0,5
Динатрия фосфат обезвоженный	3,5

- Ход приготовления питательной среды:

Размешивали 45 г сухой питательной среды в 1000 мл дистиллированной воды. Кипятили 3 мин до полного расплавления агара, фильтровали через ватный фильтр (вата медицинская гигроскопическая), стерилизовали автоклавированием в течение 15 мин при температуре  $(121\pm2)$  °С. Среду после стерилизации разливаюли по 20 мл в стерильные чашки Петри. После застывания среды, открытые чашки со средой подсушивали в течение 50-60 мин при температуре  $(37\pm1)$  °С, соблюдая правила асептики. Готовая среда использовалась в течение 7 суток при условии хранения при температуре 2-8 °С.

- Культивирование в течение 18-24 ч при 37°С.

6) Агар Айерса и Джонсона (Ayers & Johnson Agar (Stock Culture Agar), «HiMedia», Индия).

- Применение: для поддержания культур стрептококков и других условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

- Состав среды:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Настой бычьего сердца	500,0
Протеозопептон	10,0
Желатин	10,0
Глюкоза	0,5
Казеин (очищенный)	5,0
Натрия гидрофосфат	4,0
Натрия цитрат	3,0
Агар-агар	7,5
Конечное значение рН (при 25°C) 7,5 ± 0,2	

- Ход приготовления питательной среды:

Размешивали 50,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды. Подогревали до кипения для полного растворения частиц. Разливали в пробирки и стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин. Тщательно перемешивали и разливали в стерильные пенициллиновые флаконы.

- Культивирование в течение 18-48 ч при 37°C.
- Принцип и оценка результата:

Питательная среда помимо отличного бактериального роста еще обеспечивает возможность сохранить жизнеспособность стрептококков и различных других микроорганизмов в течение длительного периода времени. Стрептококки сохраняют свою жизнеспособность в течение четырех месяцев после инкубирования в питательной среде. Хорошо забуференная среда и присутствие казеина и декстрозы служит главным источником энергии. Особенно хорошо подходит для поддержания стрептококков добавление настоя из бычьего сердца, а протеозопептон, желатин и казеин, в свою очередь, служат источниками азота, витаминов и аминокислот. Декстроза используется в качестве дополнительного источника энергии, а динатрийфосфат служит в качестве буферного агента, тогда как цитрат натрия действует как консервант.

Многие привередливые микроорганизмы, такие как *Mycobacterium species*, *S. pneumoniae*, демонстрируют хороший рост на этой среде

### **2.3. Условия культивирования микроорганизмов**

Посевы инкубировали в течение 18-48 часов (в зависимости от питательной среды) при температуре 37°C в анаэробных или микроаэрофильных условиях в зависимости от типа дыхания тестовых микроорганизмов. Для создания анаэробиоза использовали CO<sub>2</sub>-Инкубатор серии 8000 WJ («Thermo Scientific», США), а для поддержания микроаэрофильных условий (концентрация O<sub>2</sub> – не более 5%) применяли метод «горящей свечи».

### **2.4. Описание культуральных свойств выросших колоний**

Изучение культуральных свойств бактерий – это один из этапов работы по определению видовой принадлежности микроорганизмов. Культуральные свойства характерны для каждого вида микроорганизмов и являются важным признаком. На поверхности плотных питательных сред микроорганизмы могут расти в виде колонии (изолированного скопления клеток одного вида, выросшего из одной клетки), штриха или сплошного газона. В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще её или на дне сосуда), различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются большим разнообразием и являются наиболее существенной особенностью роста микроорганизмов на плотном субстрате. При их описании учитывают следующие признаки:

1. Форма колонии (круглая, круглая с фестончатым краем, круглая с валиком по краю, ризоидная, с ризоидным краем, амебовидная, нитевидная, складчатая, неправильная, концентрическая, сложная).

2. Размер (диаметр) колонии – измеряют в мм, если размер колонии не превышает 1 мм, то её называют точечной, 1–2 мм – мелкой, 2–4 мм – средней, 4–6 и более мм - крупной.

3. Прозрачность. Колонии могут быть прозрачными, пропускающими свет, и мутными, через которые не видны контуры предметов.

4. Контур края (гладкий, волнистый, зубчатый, лопастной, неправильный, реснитчатый, нитчатый, ворсинчатый, ветвистый).

5. Рельеф колонии (профиль) (изогнутый, кратерообразный, бугристый, врастаящий в агар, плоский, выпуклый, каплевидный, конусовидный) характеризуется приподнятостью ее над поверхностью питательной среды и контуром формы в вертикальном разрезе. Рельеф колонии определяется невооруженным глазом или под лупой при рассматривании сверху и сбоку.

6. Поверхность колонии – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная.

7. Цвет. Для определения цвета колонии пользуются шкалой цветов А.С. Бондарцева. Особо отмечают выделение пигментов в субстрат.

8. Структура (однородная, мелкозернистая, крупнозернистая, струйчатая, волокнистая). Структура колоний определяется в проходящем свете при слабо увеличении микроскопа. У пигментированных колоний она не определяется.

9. Консистенция колоний исследуется посредством прикосновения микробиологической петлей. По консистенции колонии бывают:

- 1) пастообразные, легко снимающиеся и размазывающиеся по поверхности питательной среды наподобие сливочного масла;
- 2) вязкие или слизистые, прилипающие и тянувшиеся за петлей;

- 3) волокнистые или кожистые, плотные, снимающиеся с поверхности плотной среды в виде упругой пленки, соответствующие величине и форме колонии;
- 4) хрупкие, сухие, рассыпающиеся при прикосновении петли;
- 5) крошковатые;
- 6) плотные, врастаящие в среду.

## **2.5. Описание тинкториальных свойств выросших колоний**

Для определения морфологии клеток и их тинкториальных свойств, а также выявления принадлежности бактерий к грамположительным или к грамотрицательным группам, из части исследуемой колонии готовили мазок и окрашивали по Граму (Набор для окраски по Граму, «Диахим», Санкт-Петербург).

- Необходимые реагенты: карболовый раствор генцианвиолета, раствор Люголя, раствор сафранина.
- Подготовка к анализу:
  - 1) Предметное стекло перед исследованием должно быть тщательно вымыто и обезжирено смесью для обезжиривания предметных стекол.
  - 2) Перед использованием фуксин Циля разводят в 10 раз дистиллированной водой (из расчета – к 1 мл фуксина добавляют 9 мл дистиллированной воды).
- Приготовление мазков:
  - 1) На обезжиренное предметное стекло в каплю водопроводной воды внести бактериологической петлей небольшую часть материала с посева (чашка Петри или пробирка) соответствующей микробной тест-культуры и равномерно распределить материал в воде. С обратной стороны предметного стекла обозначить границы мазка с помощью маркера.

2) Просушить мазок на воздухе при комнатной температуре.

- Фиксация мазков:

Предметное стекло с высушенным мазком погружают в склянку с фиксирующим веществом на 10—15 минут и затем высушивают на воздухе, либо полученные мазки тщательно высушивают и затем фиксируют сухим жаром. Фиксация достигается посредством несильного нагревания (примерно до 70°C) предметного стекла, которое для этого трижды проводят над пламенем спиртовки мазком вверх в течение 5 секунд.

- Методика окраски

- 1) Поместить на мазок полоску фильтровальной бумаги и нанести на фиксированный мазок несколько капель (3-4 капли) карболового раствора генцианвиолета так, чтобы раствор полностью покрыл фильтровальную бумагу и выдержать 2-3 минуты;
- 2) Слить краску, удалить фильтровальную бумагу и сполоснуть мазок проточной водой в течение 30 секунд;
- 3) Нанести на мазок несколько капель (3-4 капли) раствора Люголя на 1-2 минуты;
- 4) Смыть краситель водопроводной водой в течение 10 секунд;
- 5) Поместить мазок в ёмкость с этиловым спиртом 96°, опуская и извлекая его до тех пор, пока мазок не обесцветится (30-60 секунд);
- 6) Промыть мазок в проточной воде в течение 1-2 минут;
- 7) Нанести на мазок несколько капель (3-4 капли) сафранина на 1-3 минуты;
- 8) Промыть стекла в проточной воде 1 минуту;
- 9) Высушить;
- 10) Микроскопировать с иммерсией в световом микроскопе (увеличение x100, окуляр x10).

## 2.6. Выделение бактериальной ДНК из выросших колоний

Для выделения тотальной ДНК микроорганизмов использовали ионообменную смолу Chelex100, приготовленную с использованием следующих реагентов: Triton X-100 (1%), Tween-20 (1%), Chelex 100, TRIS-HCl (рН 9,1, 100 mM), крезоловый красный, ddH<sub>2</sub>O. Для этого растворить 0,5 г Chelex 100, 5 мл TRIS-HCl и 0,5 мл Triton X-100 в 50 мл в ddH<sub>2</sub>O. Добавляли щепотку красителя крезоловый красный и перемешивали до полного растворения. Готовый реактив постоянно ресуспенсировали для растворения частичек, осевших на дно. Реагент хранили при температуре +4°C.

Ход работы:

1. Подготовили и расставили в штативе пробирки с отобранными бактериальными колониями, необходимое количество одноразовых стерильных пробирок типа Eppendorf объемом 1,5 мл, промаркировали.
2. В каждую пробирку с колониями одним наконечником добавляли по 200 мкл реактива. Использовали синие наконечники с фильтром. При окрашивании фильтра наконечник меняли.
3. Тщательно ресуспенсировали пробирки на вортексе и затем помещали в термостат с температурой 95°C на 10 минут. После окончания инкубации повторно перемешивали содержимое пробирок на вортексе.
4. Центрифугировали пробирки при 12 тыс об/мин в течение 5 мин на микрокентрифуге. Надосадочная жидкость содержала очищенную ДНК, готовую к постановке ПЦР.

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

## 2.7. Проведение ПЦР в режиме реального времени

Для постановки ПЦР в режиме реального времени использовали пары видоспецифичных праймеров к фрагментам ДНК исследуемых микроорганизмов (таблица 4) и 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I (ООО «СИНТОЛ», согласно инструкции производителя).

Таблица 4 - Последовательности праймеров, температуры отжига и размеры ожидаемых продуктов

Объект	Название праймера	5'-3' последовательность	Темп. отжига	Ожидаемый размер продукта (п.н.)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Ging F_Pr1 Ging R_Pr2	F: aaggcgtggtatcaaacag R: gggtaagggtcctcgctat	60°C	220
<i>Treponema denticola</i>	Dent F_Pr1 Dent R_Pr2	F: aatgaagaaggccgaaaggt R: tcaagcagtaccatgcag	60°C	245
<i>Streptococcus oralis</i>	Oral F_Pr1 Oral R_Pr2	F: cagctcgtgtcgtgagatgt R: tccgaactgagactggcttt	60°C	240
<i>Streptococcus sanguis</i>	Sang F_Pr1 Sang R_Pr2	F: tggacctgcgttgtattagc R: ccactctcacacccgttctt	60°C	239
<i>Streptococcus sobrinus</i>	Sobr F_Pr1 Sobr R_Pr2	F: caacgatacatagccgacctg R: ttagccgtcccttctggta	60°C	235
<i>Streptococcus mutans</i>	Mut F_Pr1 Mut R_Pr2	F: gcagcagttaggaaatctcg R: cgctcgggacacctacgtatta	60°C	201
<i>Streptococcus salivarius</i>	Sal F_Pr1 Sal R_Pr2	F: tcagtgtcccaactccatc R: cgcttgtgtgggtccctt	60°C	251
<i>Streptococcus macacae</i>	Mac F_Pr1 Mac R_Pr2	F: gcattgagaaagaccctgtcc R: cagtagcgggattttgc	60°C	219

ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора CFX96 Touch "REAL TIME" (Bio-Rad, США). Учет результатов проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Реакцию

амплификации проводили в 25 мкл смеси, содержащей 10 мкл 2,5х реакционной смеси ПЦР-Микс SYBR Green I, 9 мкл ddH<sub>2</sub>O, 2 мкл каждого из пары праймеров и 2 мкл тотальной ДНК.

Ход работы:

1. Подготовили и расставили в штативе пробирки с тотальной ДНК, выделенной из бактериальных культур, 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I, mQ, растворы праймеров для разморозки; ресусPENDИРОВАТЬ на вортексе.

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

3. В подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки внесли по 9 мкл mQ, после чего внесли по 10 мкл 2,5х-ной реакционной смеси, используя наконечники без фильтра.

4. Добавили в каждую пробирку по 2 мкл растворов праймеров, предварительно разведенных до 1 о.е.

5. В каждую пробирку внесли по 3 мкл ДНК исследуемого образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром.

6. Пробирки плотно закрыли, перемешали содержимое встряхиванием, затем перенесли пробирки в амплификатор и расставили соответствующим образом.

7. На приборе создавали эксперимент с соответствующими параметрами плашки: размер, тип, режим сканирования, флуорофор, названия проб; указать объем реакционной смеси в одной пробирке. Затем запускали программу со следующими параметрами:

	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95 °C	5 мин	1
Денатурация	95 °C	10 сек	35
Отжиг	59 °C	25 сек	
Элонгация	72 °C	30 сек	
Достраивание цепей ДНК	72 °C	30 сек	1

8. По окончании амплификации по показателю индикаторного цикла рассчитывали относительное количество ДНК исследуемого инфекционного агента.

## **2.8. Проведение MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа выделенных штаммов стрептококков**

Масс-спектрометрия является современным физико-химическим методом анализа, позволяющим проводить качественный и количественный анализ состава вещества, основанный на предварительной ионизации входящих в его состав атомов или молекул. Одним из новых методов ионизации, благодаря которому масс-спектрометрическое исследование макромолекул получило широкое распространение, является разработанная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI), представляющая собой импульсное лазерное облучение исследуемого вещества, смешанного с матрицей.

Для идентификации бактерий масс-спектрометр определяет спектр белков напрямую из бактериальной клетки без предварительной длительной пробоподготовки. Для каждого вида микроорганизмов сформирован характерный набор белков (биомаркеров), полученный на основе анализа не менее 50 массспектров этого вида. При этом образцы получены из различных источников (больниц, лабораторий, микробиологических коллекций), а каждый образец тщательно идентифицирован с помощью сиквенса 16s РНК или других сертифицированных методов анализа. Структурированная таким образом база данных позволяет быстро и точно идентифицировать микробиологические штаммы. База данных Vitek MS состоит из 755 клинически значимых видов (бактерий, дрожжей, плесневых грибов/дерматофитов, микобактерий) и покрывает большинство видов,

встречающихся в ежедневной практике микробиологической лаборатории, и эта база постоянно пополняется.

MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ выделенных штаммов стрептококков проводили на анализаторе микроорганизмов VITEK MS MALDI-TOF масс-спектрометр (BioMerieux, Франция). Вся методика идентификации на VITEK MS MALDI-TOF состоит из двух этапов:

### 1. Подготовка образца

На подложку (слайды для VITEK MS 32) в отдельную лунку масс-спектрометра тонким слоем наносят чистую культуру исследуемой бактерий и смешивают с 1 мкл матрицы (2',5' дигидроксибензойная кислота, раствор уже готов к использованию и устойчив к свету). Аналогичным образом в центр подложки поочередно наносят контрольные музейные культуры (LyfoCults Plus *Enterococcus faecalis* 19433, LyfoCults Plus *Candida glabrata* MYA-2950, LyfoCults Plus *Escherichia coli* 8739).

### 2. Идентификация

После этого подложку с нанесенными образцами помещают в прибор и подвергают воздействию наносекундных лазерных импульсов. При этом молекулы матрицы и аналита (в частности, белки) переходят в газовую фазу, а протонированные молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд. Под действием электрического поля ионизированные белки движутся от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам. Программное обеспечение прибора оценивает время пролета частиц и преобразует эту информацию в спектр молекулярных масс (масс-спектр). Масс-спектр сравнивается со спектрами из базы данных, и на основании сведений о массах характеристических белков происходит идентификация микроорганизмов.

## 2.9. Метод длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов

Поддержание штаммов в рабочем состоянии, сохранение их ценных свойств являются важными условиями практически любой работы с микроорганизмами – от первичного изучения до использования их в производстве различных биопрепараторов. Одним из самых нетрудоемких, не требующих дорогостоящего оборудования и в то же время незаменимого в повседневной работе с микроорганизмами является метод хранения культур под минеральным маслом. С помощью этого сравнительно простого и дешевого метода удается весьма успешно сохранять месяцами или даже годами многие виды бактерий.

Для этого метода использовали стерильное минеральное масло медицинского назначения - вазелиновое масло с удельной плотностью 0,865–0,890 г/см<sup>3</sup>.

- Техника проведения.
- 1) Масло стерилизовали в сушильном шкафу при температуре 170 °С в течение 1–2 ч, поскольку автоклавирование для этой цели применять не рекомендуется.
  - 2) Культуры выращивали в толще агаризованной среды (столбиках).
  - 3) Во флаконы с выросшими микроорганизмами стерильно наливали слой минерального масла высотой не менее 2 см. Слой масла служил защитой культур от высыхания, одновременно понижая их метаболизм. Покрытые маслом культуры хранили в вертикальном положении в холодильнике.
  - 4) Для проверки сохранности культур следует периодически определять их жизнеспособность. Обычно культуры пересевают 1–2 раза в год на свежую среду. Для этого используют инокуляционные иглы или петли. При обжиге иглы (петли) следует позаботиться о

том, чтобы брызги масла не попали на окружающие предметы и персонал.

- 5) Пересеянные культуры снова покрывают стерильным маслом, а исходные материалы хранят до тех пор, пока не станет ясно, что заложенный на хранение штамм не загрязнен и не изменен.

## **2.10. Определение антимикробной активности растительных экстрактов**

В качестве тестовых микроорганизмов использовали штаммы *Escherichia coli* №25922, *Candida albicans* №24433, *Staphylococcus aureus* №966 из коллекции Клиники и штаммы *Streptococcus oralis* №27417 и *Streptococcus sobrinus* №28417, из коллекции кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, изолированные от больных с пародонтитом. Чувствительность определяли полуколичественным диско-диффузионным методом на среде Мюллера-Хинтона («HiMedia», Индия), на которую в течение 15 минут после приготовления «сплошным газоном» высевали стандартный инокулум, соответствующий значению 0,5 по МакФарланду и содержащий  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл бактерий.

Для проведения опыта использовались пленки, пропитанные экстрактом травы тысячелистника (*herba Millefolii*) (диск №1), аптечным препаратом - 10% настойкой прополиса (диск №2), экстрактом цветков календулы (*flores Calendulae*) (диск №3) и смесью экстрактов травы тысячелистника (*herba Millefolii*), цветков календулы (*flores Calendulae*) и 10% настойки прополиса (диск №4). В качестве положительного контроля использовали диски с оксациллином в концентрации 1 мкг на диск («HiMedia», Индия). В качестве отрицательного контроля использовали диски из пленки без какой-либо пропитки. Посевы инкубировали в течение суток при температуре 37°C в анаэробных и микроаэрофильных условиях

(метод «горячей свечи») в атмосфере, обогащенной СО<sub>2</sub>. Исследования проводили в 3-х сериях. Активность оценивали по среднеарифметическому значению диаметра зон задержки роста (мм).

## **2.11. Определение противомикробной активности химических соединений**

Противомикробную активность химических соединений оценивали полуколичественным диско-диффузионным методом. Для этого готовили рабочие растворы из имевшихся навесок тестируемых веществ в стерильных флаконах, которые растворяли в 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО) с вычислением процентной концентрации (C%, %). Перед исследованием готовили диски из фильтровальной бумаги диаметром 5 мм, стерилизовали в сухожаровом шкафу, пропитывали рабочим раствором тестируемого вещества и высушивали в термостате.

В качестве тестовых микроорганизмов использовали музейные штаммы:

*Escherichia coli* №25922 (Коллекция Клиники БГМУ),

*Staphylococcus aureus* №966 (Коллекция Клиники БГМУ),

*Streptococcus oralis* №27417 (Коллекция кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ),

*Streptococcus sobrinus* №28417 (Коллекция кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ),

*Candida albicans* №24433 (Коллекция Клиники БГМУ).

Перед исследованием тестовые культуры микроорганизмов суспендировали в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия и готовили стандартный инокулюм, соответствующий значению 0,5 по стандарту мутности МакФарланда и содержащий  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл бактерий. По 0,1 мл инокулюма в течение 15 минут после приготовления засевали «сплошным газоном» на среду АГВ («Микроген», Россия). Подсушивали,

после чего на поверхность питательной среды с соблюдением правил асептики укладывали диски с исследуемыми соединениями, диск с диметилсульфоксидом (ДМСО) (отрицательный контроль) и диск с левофлоксацином (положительный контроль) (5 мкг/мл; «HiMedia», Индия) – не более 6 на 1 чашку Петри.

Посевы инкубировали в течение 16-18 часов при температуре 37°C в аэробных или микроаэрофильных условиях в зависимости от типа дыхания тестовых микроорганизмов. Для создания микроаэрофильных условий (концентрация O<sub>2</sub> – не более 5%) использовали метод «горящей свечи». Антибактериальную активность исследуемых химических соединений полуколичественно оценивали по диаметру зон задержки роста микроорганизмов (мм).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 3.1. Исследование культуральных свойств выросших колоний

Одним из этапов работы по определению видовой принадлежности микроорганизмов является изучение культуральных свойств бактерий. Данные свойства важными признаками, характеризующими каждый вид микроорганизмов в отдельности. Колонии, выросшие на поверхности питательной среды, отличаются большим разнообразием и являются наиболее существенной особенностью роста микроорганизмов на плотном субстрате. При описании колоний учитывают такие признаки как форма, размер (диаметр), прозрачность, контур края, рельеф (профиль), поверхность, цвет, структура и консистенция колоний.

Проводилось изучение культуральных свойств бактерий для ориентировочного определения видовой принадлежности микроорганизмов. С помощью оптического микроскопа со встроенной аналогово-цифровой фотокамерой Leica DFC 280 были получены микрофотографии колоний, выросших на плотном агаре (рисунок 2-14). В большинстве случаев колонии были относительно мелкие 1,5-4,5 мм в диаметре, серовато зеленого-цвета, с гладкой или шероховатой поверхностью. Описание культуральных свойств всех выросших колоний представлено в таблице 5.

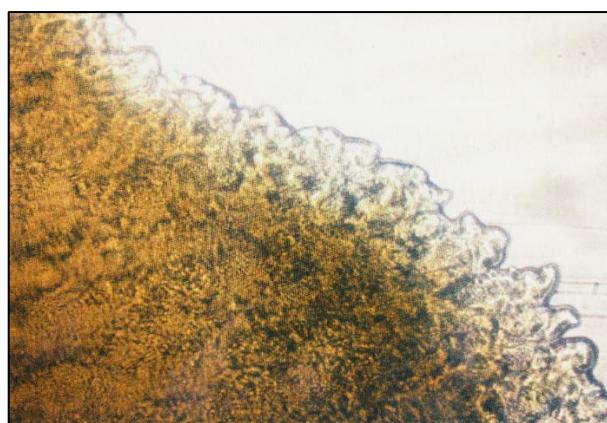


Рисунок 2 – Поверхность колонии на селективном агаре для стрептококков («HiMedia», Индия). Leica DFC280. Ув. 100.



Рисунок 3 – Колония бактерий на селективном агаре для стрептококков («HiMedia», Индия). Leica DFC280. Ув. 100.

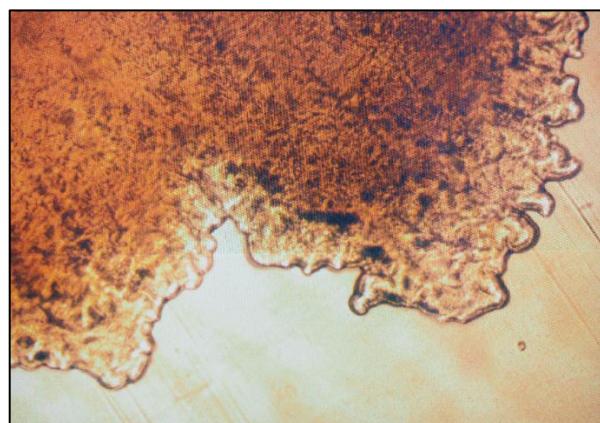


Рисунок 4 – Поверхность колонии на селективном агаре для стрептококков («HiMedia», Индия). Leica DFC280. Ув. 100.

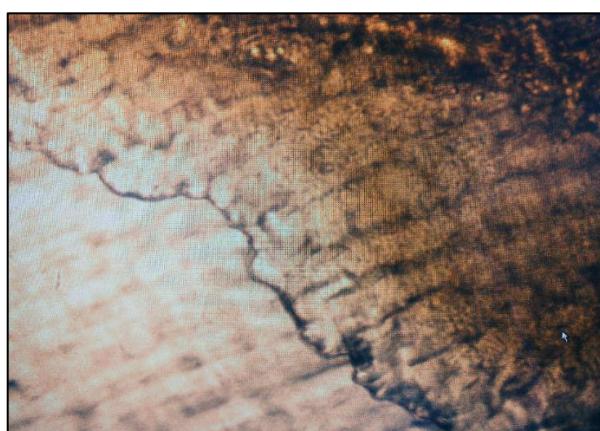


Рисунок 5 – Поверхность колонии на селективном агаре для стрептококков («HiMedia», Индия). Leica DFC280. Ув. 100.



Рисунок 6 – Поверхность колонии на селективном агаре для стрептококков («HiMedia», Индия). Leica DFC280. Ув. 100.

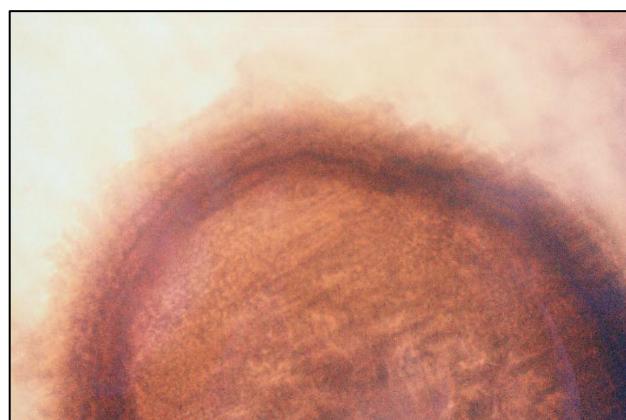


Рисунок 7 – Поверхность колонии на селективном агаре для стрептококков («HiMedia», Индия). Leica DFC280. Ув. 100.

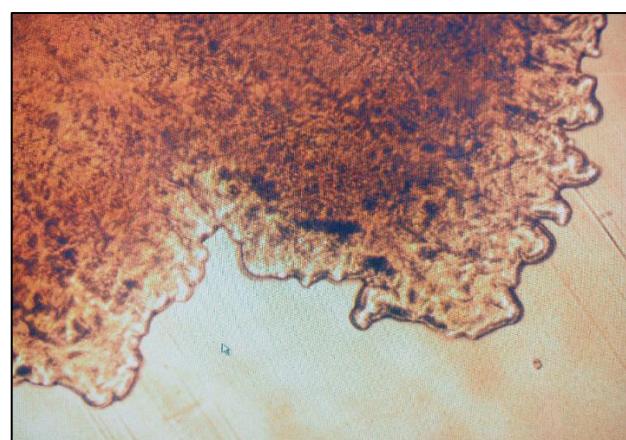


Рисунок 8 – Поверхность колонии на селективном агаре для стрептококков («HiMedia», Индия). Leica DFC280. Ув. 100.

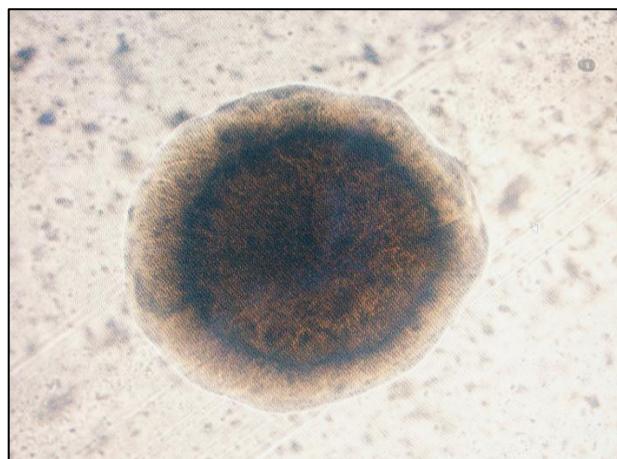


Рисунок 9 – Колония бактерий на селективном агаре для стрептококков («HiMedia», Индия). Leica DFC280. Ув. 100.

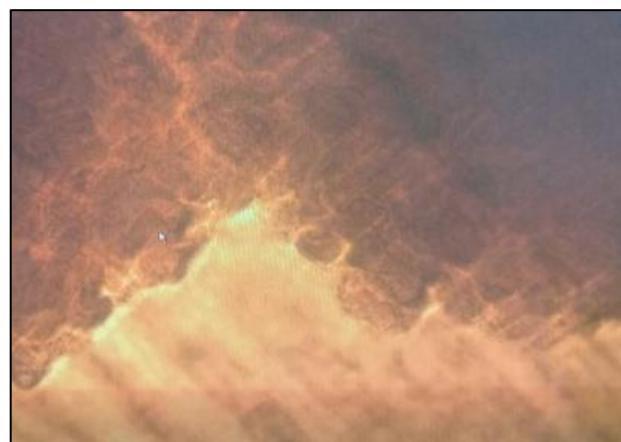


Рисунок 10 – Поверхность колонии на селективном агаре для стрептококков («HiMedia», Индия). Leica DFC280. Ув. 100.



Рисунок 11 – Колония бактерий на селективном агаре для стрептококков («HiMedia», Индия). Leica DFC280. Ув. 100.



Рисунок 12 – Поверхность колонии на селективном агаре для стрептококков («HiMedia», Индия). Leica DFC280. Ув. 100.

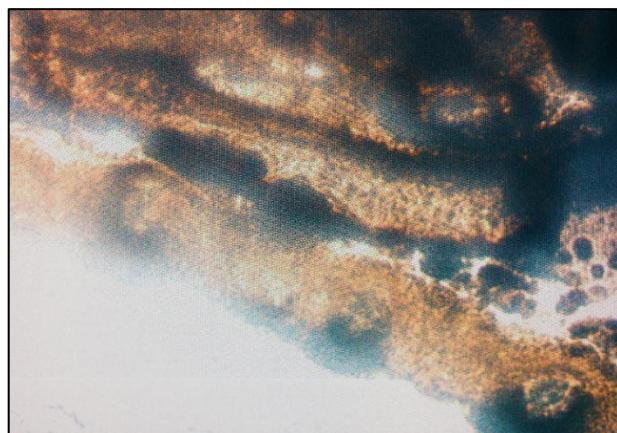


Рисунок 13 – Поверхность колонии на селективном агаре для стрептококков («HiMedia», Индия). Leica DFC280. Ув. 100.

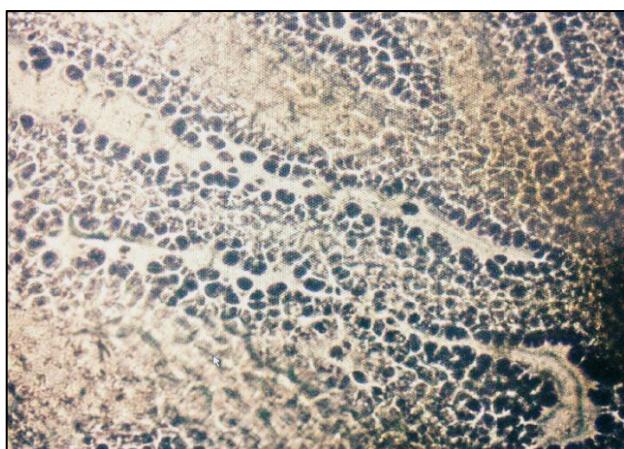


Рисунок 14 – Поверхность колонии на селективном агаре для стрептококков («HiMedia», Индия). Leica DFC280. Ув. 100.

Таблица 5 - Описание культуральных свойств выросших колоний

№	Тип колоний	Форма колоний	Размер (диаметр) колоний, мм	Поверхность колоний	Профиль колоний	Блеск и прозрачность колоний	Цвет колоний	Край колоний	Структура колоний
1	Поверхностные	ризоидная	5	гладкая	выпуклый	мутные	пигментированная	Волнистый	Крупнозернистая
2	Поверхностные	круглая с фестончатым краем	7	бороздчатая	выпуклый	мутные	пигментированная	Волнистый	Крупнозернистая
3	Поверхностные	ризоидная	7	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Крупнозернистая
4	Поверхностные	ризоидная	4	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Крупнозернистая
5	Поверхностные	амебовидная	5	гладкая	выпуклый	мутные	пигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
6	Поверхностные	ризоидная	6	гладкая	выпуклый	мутные	пигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
7	Поверхностные	круглая	4	гладкая	выпуклый	мутные	пигментированная	Гладкий	Однородная
8	Поверхностные	круглая	4	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
9	Поверхностные	ризоидная	4	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Крупнозернистая
10	Поверхностные	ризоидная	5	гладкая	плоский	прозрачные	непигментированная	Гладкий	Мелкозернистая
11	Поверхностные	ризоидная	6	гладкая	плоский	прозрачные	непигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
12	Поверхностные	ризоидная	7	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
13	Поверхностные	круглая с фестончатым краем	6	гладкая	выпуклый	мутные	пигментированная	Волнистый	Однородная
14	Поверхностные	ризоидная	4	бороздчатая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
15	Поверхностные	ризоидная	4	бороздчатая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Однородная
16	Поверхностные	круглая	4	бороздчатая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Крупнозернистая

№	Тип колоний	Форма колоний	Размер (диаметр) колоний, мм	Поверхность колоний	Профиль колоний	Блеск и прозрачность колоний	Цвет колоний	Край колоний	Структура колоний
17	Поверхностные	амебовидная	5	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Крупнозернистая
18	Поверхностные	ризоидная	4	гладкая	плоский	мутные	непигментированная	Волнистый	Крупнозернистая
19	Поверхностные	круглая	4	бороздчатая	выпуклый	мутные	пигментированная	Волнистый	Крупнозернистая
20	Поверхностные	круглая	5		плоский	мутные	пигментированная	Гладкий	Однородная
21	Поверхностные	ризоидная	6	гладкая	выпуклый	мутные	пигментированная	Волнистый	Однородная
22	Поверхностные	круглая	7	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
23	Поверхностные	ризоидная	7	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
24	Поверхностные	ризоидная	7	гладкая	выпуклый	мутные	пигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
25	Поверхностные	ризоидная	6	гладкая	выпуклый	мутные	пигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
26	Поверхностные	круглая с фестончатым краем	5	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
27	Поверхностные	круглая с фестончатым краем	6	гладкая	плоский	мутные	непигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
28	Поверхностные	ризоидная	5	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Гладкий	Однородная
29	Поверхностные	ризоидная	6	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
30	Поверхностные	амебовидная	7	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
31	Поверхностные	ризоидная	5	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Однородная
32	Поверхностные	круглая	6	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Однородная
33	Поверхностные	круглая	6	гладкая	плоский	мутные	пигментированная	Волнистый	Крупнозернистая
34	Поверхностные	ризоидная	5	гладкая	плоский	прозрачные	непигментированная	Волнистый	Мелкозернистая

№	Тип колоний	Форма колоний	Размер (диаметр) колоний, мм	Поверхность колоний	Профиль колоний	Блеск и прозрачность колоний	Цвет колоний	Край колоний	Структура колоний
35	Поверхностные	ризоидная	5	гладкая	плоский	мутные	непигментированная	Волнистый	Мелкозернистая
36	Поверхностные	круглая с фестончатым краем	4	гладкая	выпуклый	мутные	непигментированная	Волнистый	Мелкозернистая

### **3.2. Исследование тинкториальных свойств выросших колоний**

Для определения морфологии клеток и их тинкториальных свойств, а также выявления принадлежности бактерий к грамположительным или к грамотрицательным группам, из части исследуемой колонии готовили мазок и окрашивали по Граму. Из колоний, подозрительных в отношении стрептококка, бактериальной петлей брали небольшое количество материала, делали мазки, окрашивали по Граму и микроскопировали.

Фотографии мазков из содержимого пародонтальных карманов:



Рисунок 15 – Мазок исследуемой колонии бактерий; грамотрицательные кокки. Микромед С-1. Ув. 100.



Рисунок 16 – Мазок исследуемой колонии бактерий; грамотрицательные спироиллы. Микромед С-1. Ув. 100.

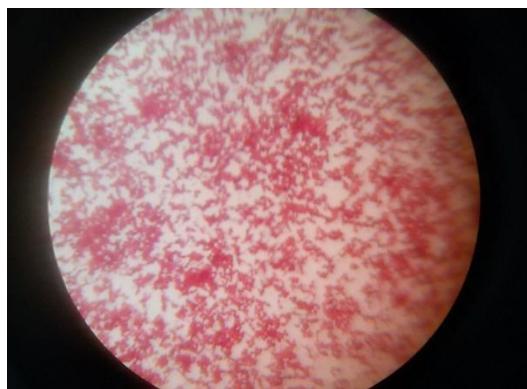


Рисунок 17 – Мазок исследуемой колонии бактерий; грамотрицательные кокки. Микромед С-1. Ув. 100.



Рисунок 18 – Мазок исследуемой колонии бактерий; грамположительные кокки. Микромед С-1. Ув. 100.



Рисунок 19 – Мазок исследуемой колонии бактерий; грамотрицательные спирilli. Микромед С-1. Ув. 100.

### **3.3. Проведение MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа выделенных штаммов стрептококков**

Масс-спектрометрия является достаточно достоверным и точным физико-химическим методом анализа, позволяющим проводить качественный и количественный анализ состава анализируемого вещества. Ввиду перечисленных выше достоинств, данный метод был выбран нами для идентификации выделенных микробиологических штаммов. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ выделенных штаммов бактерий проводили на анализаторе микроорганизмов VITEK MS MALDI-TOF масс-спектрометр (BioMerieux, Франция). Программа прибора сопоставляла полученные масс-спектры рибосомальных белков с базой данных, содержащих аналогичные эталонные спектры для большинства микроорганизмов, и выдавала наиболее вероятный результат, при этом указывая условное значение Score (Score >2,3 – результат высокодостоверный), характеризующее качество и точность анализа.

Проведенный анализ микрофлоры пародонтальных карманов у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести позволил выявить преобладание факультативно-анаэробных грамположительных кокков: *Streptococcus mitis* (41,7%), *Streptococcus sanguis* (25,0%), *Streptococcus oralis* (16,7%), *Streptococcus sobrinus* (16,7%).

В ходе проведения масс-спектрометрического анализа выделенных штаммов бактерий были получены масс-спектры:

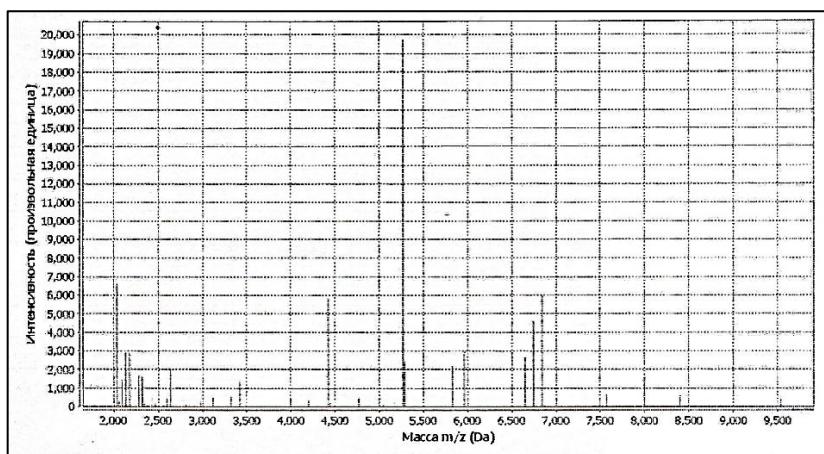


Рисунок 20 – Масс-спектр пародонтопатогенного вида

*Streptococcus mitis*(I). VITEK MS MALDI-TOF (BioMerieux, Франция).

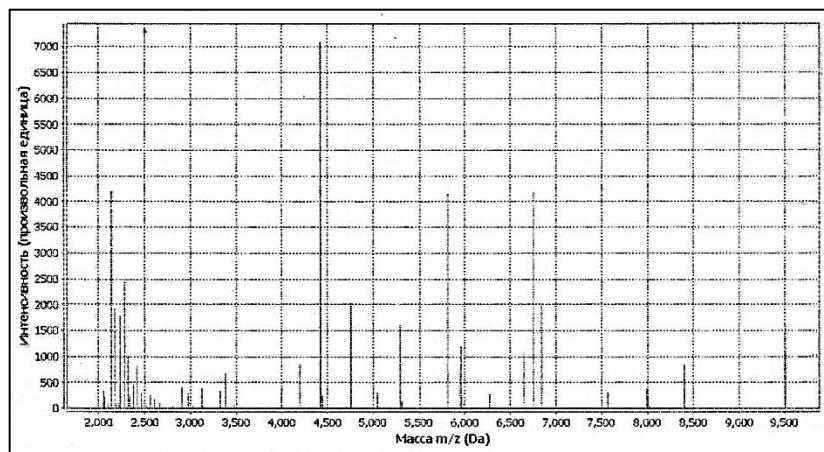


Рисунок 21 – Масс-спектр пародонтопатогенного вида

*Streptococcus mitis* (II). VITEK MS MALDI-TOF (BioMerieux, Франция).

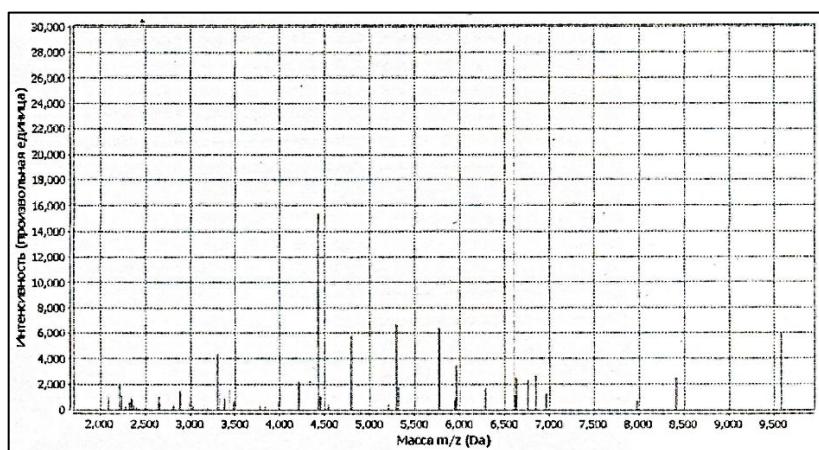


Рисунок 22 – Масс-спектр пародонтопатогенного вида

*Streptococcus oralis* (I). VITEK MS MALDI-TOF (BioMerieux, Франция).

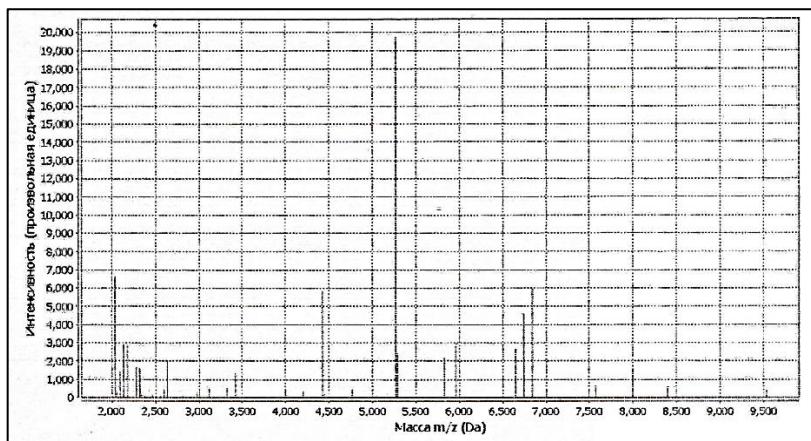


Рисунок 23 – Масс-спектр пародонтопатогенного вида *Streptococcus oralis* (II). VITEK MS MALDI-TOF (BioMerieux, Франция).

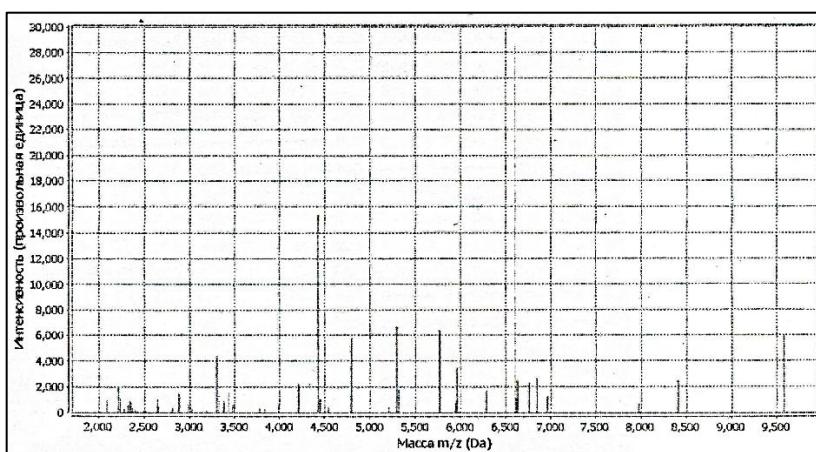


Рисунок 24 – Масс-спектр пародонтопатогенного вида *Streptococcus sanguis* (I). VITEK MS MALDI-TOF (BioMerieux, Франция).

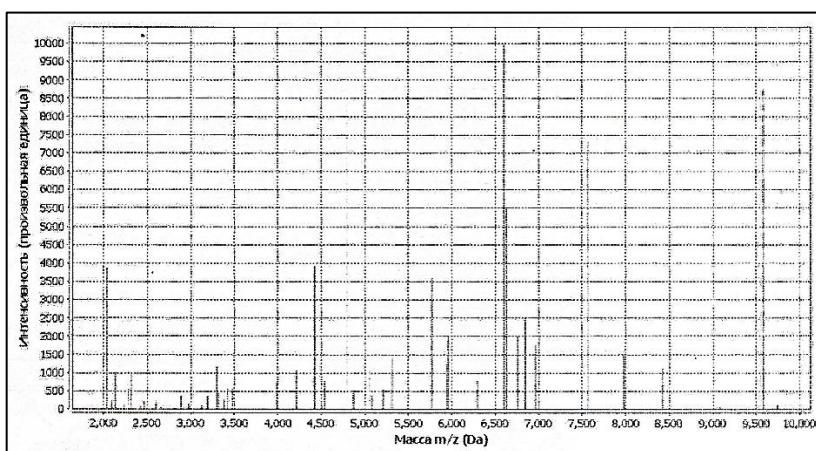


Рисунок 25 – Масс-спектр пародонтопатогенного вида *Streptococcus sanguis* (II). VITEK MS MALDI-TOF (BioMerieux, Франция).

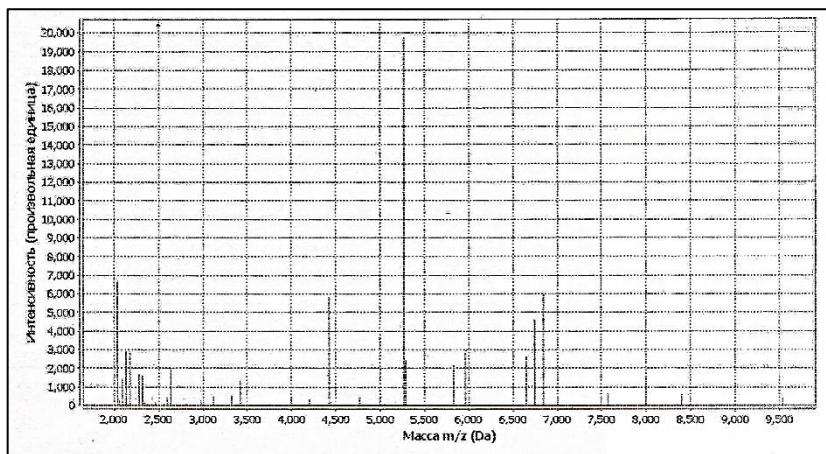


Рисунок 26 – Масс-спектр пародонтопатогенного вида *Streptococcus sobrinus* (I). VITEK MS MALDI-TOF (BioMerieux, Франция).

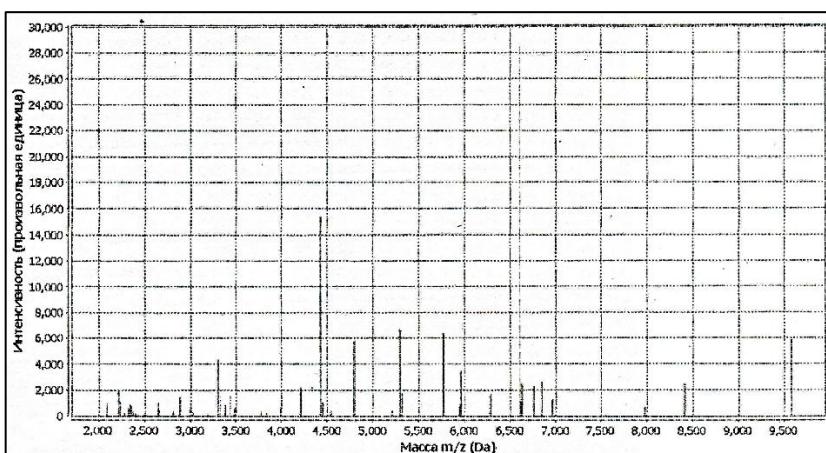


Рисунок 27 – Масс-спектр пародонтопатогенного вида *Streptococcus sobrinus* (II). VITEK MS MALDI-TOF (BioMerieux, Франция).

### **3.4. Проведение молекулярно-генетического анализа выделенных штаммов стрептококков**

Молекулярно-генетическое исследование культур бактерий, выросших на плотной питательной среде, проводилось для подтверждения результатов масс-спектрометрического анализа. Методом ПЦР в режиме реального времени выявляли ДНК пародонтопатогенных стрептококков: *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus macacae*.

Результаты были полностью сопоставимы, были получены графики амплификации для следующих пародонтопатогенных видов: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus*.

Полученные графики амплификации:

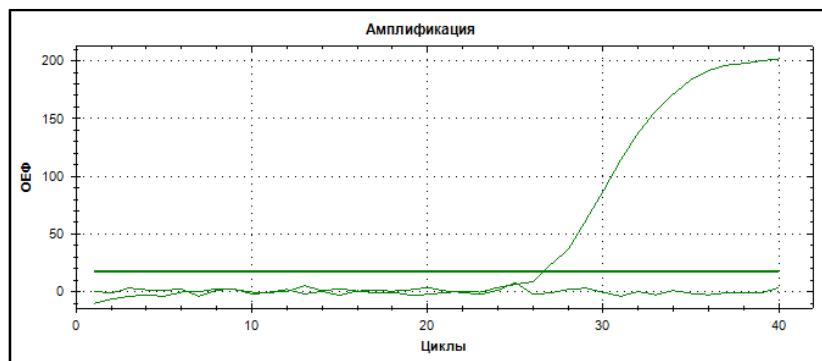


Рисунок 28 – График амплификации участков генов 16S рРНК пародонтопатогенного вида *Streptococcus mitis*.

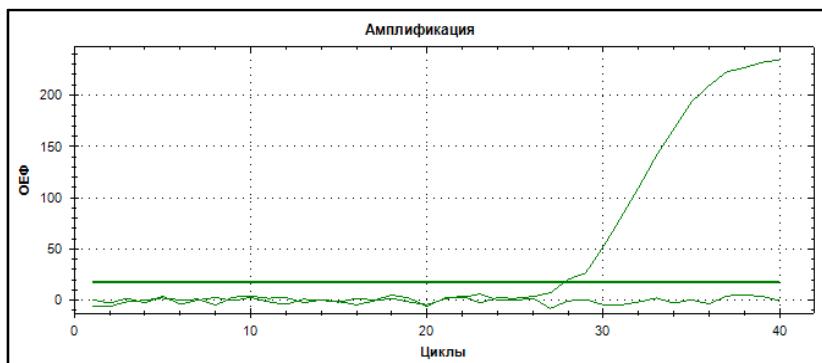


Рисунок 29 – График амплификации участков генов 16S рРНК пародонтопатогенного вида *Streptococcus oralis*.

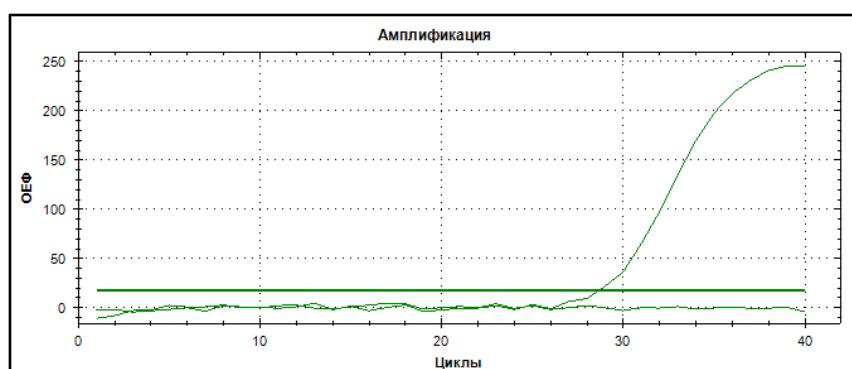


Рисунок 30 – График амплификации участков генов 16S рРНК пародонтопатогенного вида *Streptococcus sanguis*.

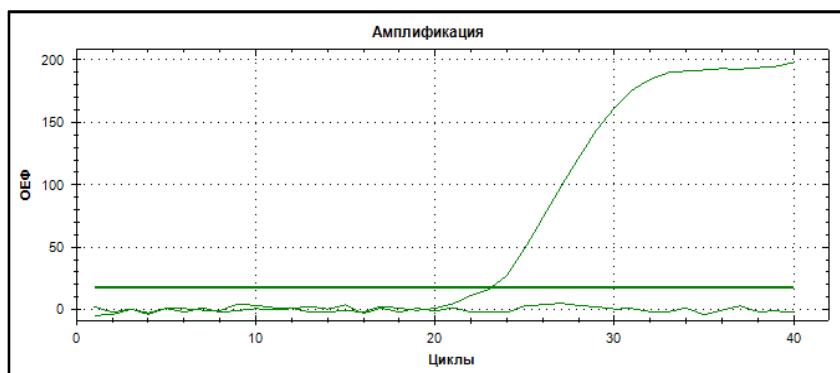


Рисунок 31 – График амплификации участков генов 16S рРНК пародонтопатогенного вида *Streptococcus sobrinus*.

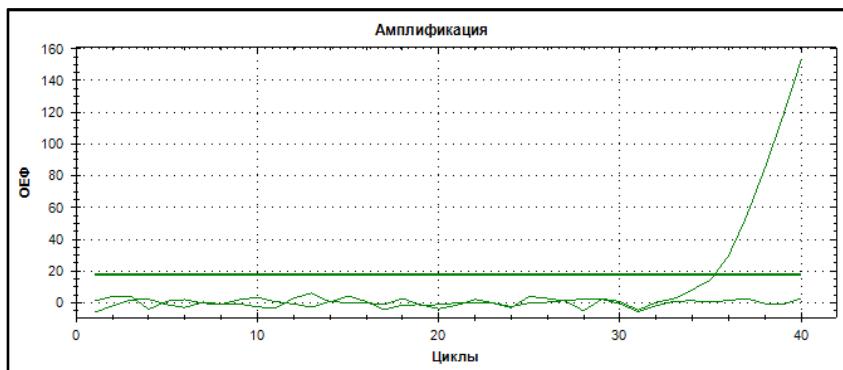


Рисунок 32 – График амплификации участков генов 16S рРНК пародонтопатогенного вида *Streptococcus mitis*.

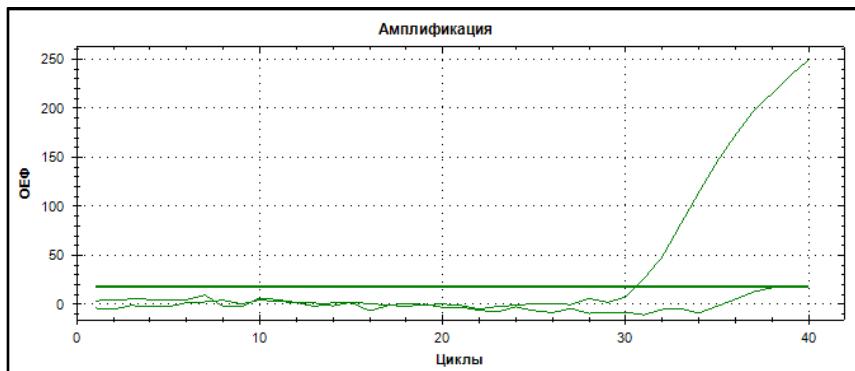


Рисунок 33 – График амплификации участков генов 16S рРНК пародонтопатогенного вида *Streptococcus oralis*.

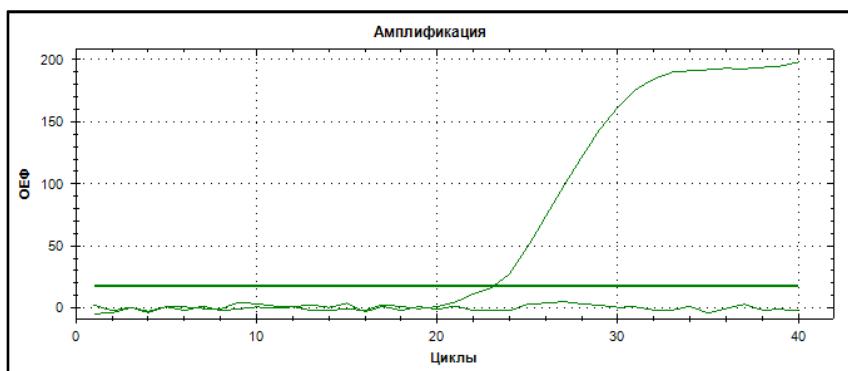


Рисунок 34 – График амплификации участков генов 16S рРНК пародонтопатогенного вида *Streptococcus sanguis*.

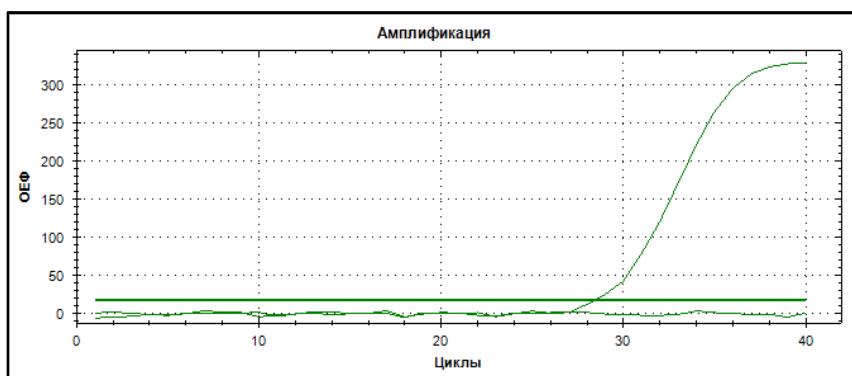


Рисунок 35 – График амплификации участков генов 16S рРНК пародонтопатогенного вида *Streptococcus sobrinus*.

### **3.5. Реализация метода длительного хранения коллекционных культур пародонтопатогенных микроорганизмов**

Для поддержания штаммов в рабочем состоянии и сохранения их ценных свойств использовали метод хранения культур под минеральным маслом. Данная методика ввиду сравнительной нетрудоемкости и дешевизны позволяет весьма успешно сохранять месяцами или даже годами многие виды бактерий. Для этого метода использовали агар Айерса и Джонсона (Ayers & Johnson Agar (Stock Culture Agar), «HiMedia», Индия), применяемого для поддержания культур стрептококков и других условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Таким образом были получены 12 коллекционных штаммов пародонтопатогенных видов

стрептококков (5 штаммов *Streptococcus mitis*, 3 штамма *Streptococcus sanguis*, 2 штамма *Streptococcus oralis* и 2 штамма *Streptococcus sobrinus*).

### **3.6. Определение антимикробной активности растительных экстрактов полукаличественным диско-диффузионным методом**

В ходе проведения эксперимента был проведен анализ средних значений диаметров зон задержки роста микроорганизмов на плотном агаре (таблица 6).

Таблица 6 - Результаты определения чувствительности микроорганизмов *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus* к антибактериальным препаратам: значения диаметров зон подавления роста (мм)  
(указаны результаты трех повторностей эксперимента)

Виды бактерий	Лекарственные растения и растительные средства, обладающие антимикробным эффектом			Антибактериальный препарат Оксациллин (концентрация в диске 1 мкг)
	Тысячелистник обыкновенный	Прополис	Календула лекарственная	
<i>Escherichia coli</i>	-	13	-	7
	7	15	-	7
	6	8	-	10
<i>Candida albicans</i>	19	17	-	15
	10	18	-	11
	8	17	-	22
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	16	-	11
	9	15	7	19
	12	20	6	19
<i>Streptococcus oralis</i>	-	18	-	19
	7	13	-	5
	6	-	-	11

Виды бактерий	Лекарственные растения и растительные средства, обладающие антимикробным эффектом				Антибактериальный препарат
	Тысячелистник обыкновенный	Прополис	Календула лекарственная	Смесь тысячелистника обыкновенного, прополиса и календулы лекарственной	
<i>Streptococcus sobrinus</i>	-	10	-	10	-
	9	12	-	14	-
	8	14	-	16	-

По результатам анализа в отношении всех видов протестированных микроорганизмов наибольшей антимикробной активностью обладал экстракт прополиса (14,8 мм). Сопоставимые результаты были получены при исследовании смеси (тысячелистник обыкновенный (*herba Millefolii*) + прополис + календула лекарственная (*flores Calendulae*)), также проявившей высокую противомикробную активность по отношению ко всем протестированным микроорганизмам и оцененной по среднему значению диаметра зон задержки роста – 13,1 мм. Наименьшая антимикробная активность, характеризовавшаяся средним диаметром зон задержки роста 1,3 мм, имела место при тестировании экстракта цветков календулы (*flores Calendulae*). Наибольшим спектром антибактериальной активности, включавшем грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также грибы (*C.albicans*) обладали 3 экстракта: на основе прополиса, из смеси (тысячелистник обыкновенный (*herba Millefolii*) + прополис + календула лекарственная (*flores Calendulae*) и из травы тысячелистника (*herba Millefolii*) (таблица 7).

Таблица 7 - Результаты определения чувствительности микроорганизмов *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus* к антибактериальным препаратам: средние значения диаметров зон подавления роста (мм)

Виды бактерий	Лекарственные растения и растительные средства, обладающие антимикробным эффектом				Антибактериальный препарат Оксациллин (концентрация 1 мкг) в диске 1 мкг)
	Тысячелистник обыкновенный	Прополис	Календула лекарственная	Смесь тысячелистника обыкновенного, прополиса и календулы лекарственной	
<i>Escherichia coli</i>	6,5	12,0	-	8,0	10,0
<i>Candida albicans</i>	12,3	17,3	-	16,0	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,5	17,0	6,5	16,3	6,7
<i>Streptococcus oralis</i>	6,5	15,5	-	11,7	-
<i>Streptococcus sobrinus</i>	8,5	12,0	-	13,3	-

### 3.7. Определение противомикробной активности химических соединений полуколичественным диско-диффузионным методом

Анализ значений диаметров зон задержки роста позволил выявить наиболее выраженные противомикробные свойства у нескольких химических соединений. Соединения в большинстве случаев проявляли antimикробную активность по отношению сразу к 3 видам из всего перечня тестируемых микроорганизмов (таблица 8).

Таблица 8 - Результаты определения противомикробной активности химических соединений

№	Химическое соединение	Концентрация раствора (С%)	Виды микроорганизмов				
			<i>Escherichia coli</i>	<i>Methylococcus aureu</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Treptococcus sobrinu</i>	<i>Candida albicans</i>
40	SER-001	0,09	-	-	12	-	-
2	SER-002	0,18	-	-	-	-	-
13	SER-003	0,27	-	-	23	-	-
1	SER-036	3,27	-	-	-	-	-
5	SER-043	3,91	-	15	-	-	-
10	SER-066	5,99	-	-	19	-	-
7	SEV-150	13,63	-	44	14	-	30
11	SEV-151	13,72	-	-	-	10	14
4	SEV-154	13,99	-	-	22	16	-
18	SEV-158	14,36	-	-	10	-	-
9	SEV-182,3	16,57	-	34	18	-	16
3	SEV-196	17,81	-	23	21	18	-
6	SEV-206	18,72	-	8	14	-	-
12	SEV-225,22	20,47	-	-	24	16	-
8	SEV-226,31	20,57	-	-	22	-	-
16	TEV-001	0,09	-	14	20	22	-
33	TEV-002	0,18	-	-	20	13	-
27	TEV-006	0,55	-	9	-	19	19
19	TEV-012	1,09	-	28	-	-	-
36	TEV-016	1,45	-	-	-	8	-
32	TEV-102	9,27	-	-	15	9	16
21	TEV-103	9,36	-	-	-	-	14
29	TEV-104	9,45	-	8	-	16	-
39	TEV-105	9,54	-	-	18	17	-
14	TEV-106	9,63	-	-	14	-	-
30	TEV-108	9,81	-	-	-	7	-
22	TEV-200	18,18	-	-	-	-	-
17	TEV-201	18,27	-	-	21	-	-
38	TEV-202	18,36	-	-	-	-	-
20	TEV-240	21,81	-	-	-	-	-
34	TEV-3096	281,35	-	-	12	14	-
37	TEV-3097	281,44	-	-	-	9	-
35	TEV-3099	281,62	-	-	10	13	8
31	TEV-320	29,08	-	-	-	10	-

№	Химическое соединения	Концентрация раствора (C%)	Виды микроорганизмов				
			<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureu</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus sobrinu</i>	<i>Candida albicans</i>
28	TEV-326	29,63	-	9	-	9	-
24	TEV-346	31,44	-	-	-	-	-
23	TEV-347	31,53	-	-	12	12	11
26	TEV-362	32,89	-	-	-	-	18
15	TEV-601	54,62	-	-	-	14	-
25	TEV-691	62,79	-	-	12	-	12

Примечание: диаметр зоны задержки роста – (мм)

Для соединений SEV-150 ( $C\% = 13,63$ ), SEV-182,3 ( $C\% = 16,57$ ) была показана антимикробная активность в отношении видов *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis* и *Candida albicans*. Соединения SEV-196 ( $C\% = 17,81$ ) и TEV-001( $C\% = 0,09$ ) подавляли рост микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus*; TEV-006 ( $C\% = 0,55$ ) ингибиравал рост микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus* и *Candida albicans*; TEV-102 ( $C\% = 9,27$ ), TEV-3099 ( $C\% = 281,62$ ), TEV-347 ( $C\% = 31,53$ ) ингибиравали рост *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus* и *Candida albicans*.

Результаты определения противомикробной активности химических соединений.

### I. *Escherichia coli* №25922



Рисунок 36 – Зоны ингибирования роста колоний *Escherichia coli* под действием химических соединений SER-036, SER-002, SEV-196, SEV-154 и SER-043 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

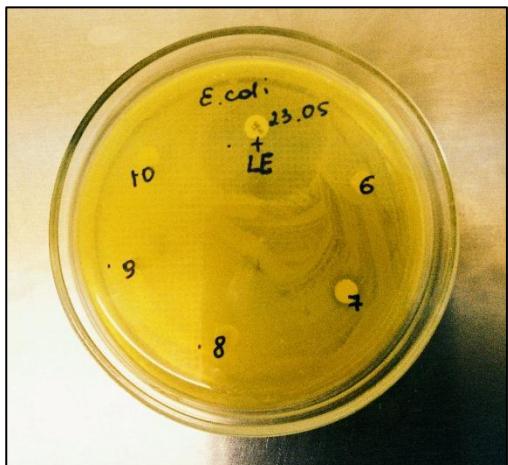


Рисунок 37 – Зоны ингибирования роста колоний *Escherichia coli* под действием химических соединений SEV-206, SEV-150, SEV-226,31, SEV-182,3 и SER-066 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

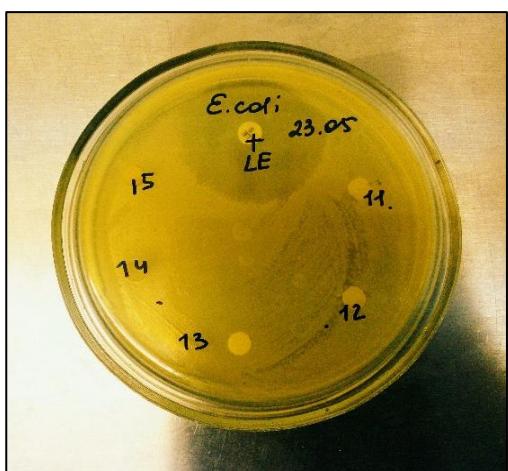


Рисунок 38 – Зоны ингибирования роста колоний *Escherichia coli* под действием химических соединений SEV-151, SEV-225,22, SER-003, TEV-106 и TEV-601 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 39 – Зоны ингибирования роста колоний *Escherichia coli* под действием химических соединений TEV-201, SEV-158, TEV-012, TEV-240 и TEV-103 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

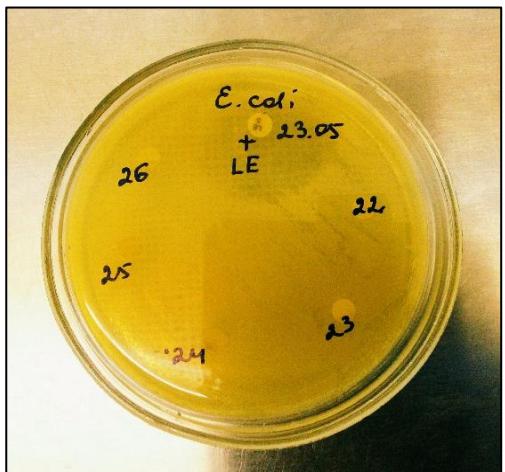


Рисунок 40 – Зоны ингибирования роста колоний *Escherichia coli* под действием химических соединений TEV-200, TEV-347, TEV-346, TEV-691 и TEV-362 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

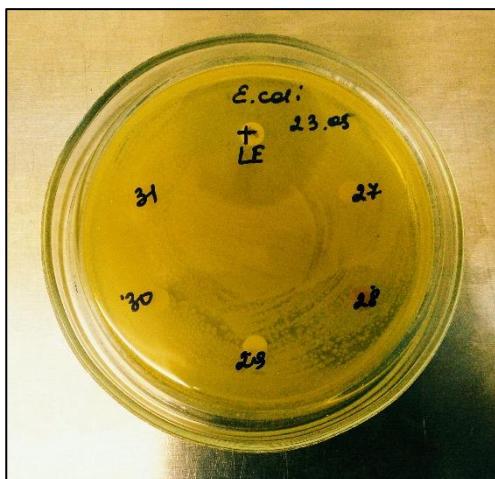


Рисунок 41 – Зоны ингибирования роста колоний *Escherichia coli* под действием химических соединений TEV-006, TEV-326, TEV-104, TEV-108 и TEV-320 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 42 – Зоны ингибирования роста колоний *Escherichia coli* под действием химических соединений TEV-102, TEV-002, TEV-3096, TEV-3099 и TEV-016 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

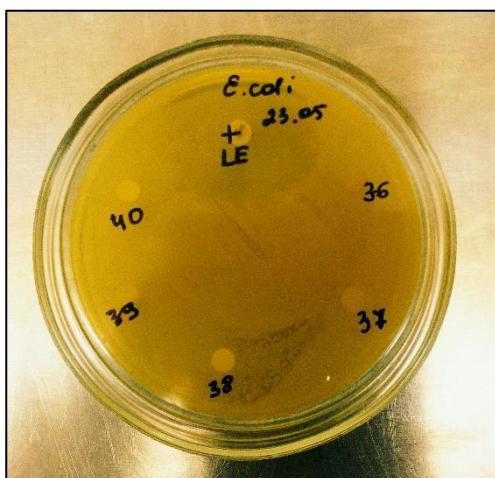


Рисунок 43 – Зоны ингибирования роста колоний *Escherichia coli* под действием химических соединений TEV-016, TEV-3097, TEV-202, TEV-105 и SER-001 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

II. *Staphylococcus aureus* №966



Рисунок 44 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений SER-036, SER-002, SEV-196, SEV-154 и SER-043 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 45 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений SEV-206, SEV-150, SEV-226,31, SEV-182,3 и SER-066 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

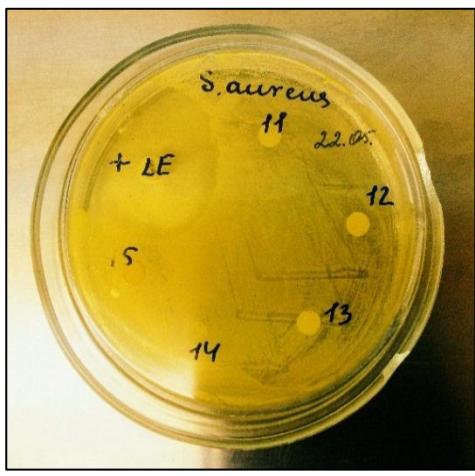


Рисунок 46 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений SEV-151, SEV-225,22, SER-003, TEV-106 и TEV-601 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

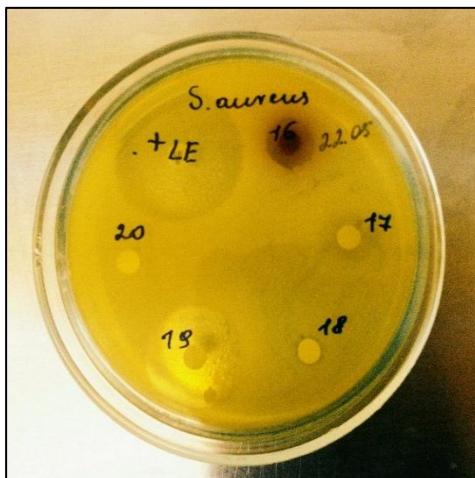


Рисунок 47 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений TEV-201, SEV-158, TEV-012, TEV-240 и TEV-103 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 48 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений TEV-200, TEV-347, TEV-346, TEV-691 и TEV-362 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 49 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений TEV-006, TEV-326, TEV-104, TEV-108 и TEV-320 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

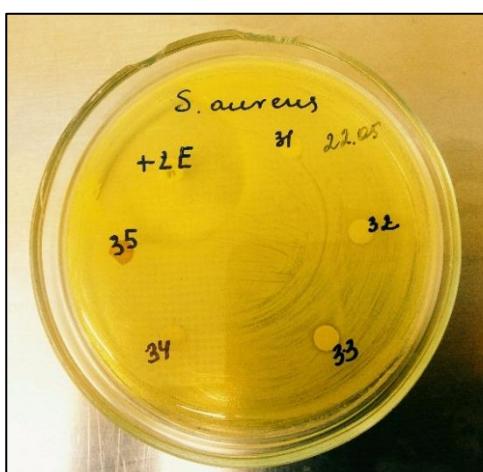


Рисунок 50 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений TEV-102, TEV-002, TEV-3096, TEV-3099 и TEV-016 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

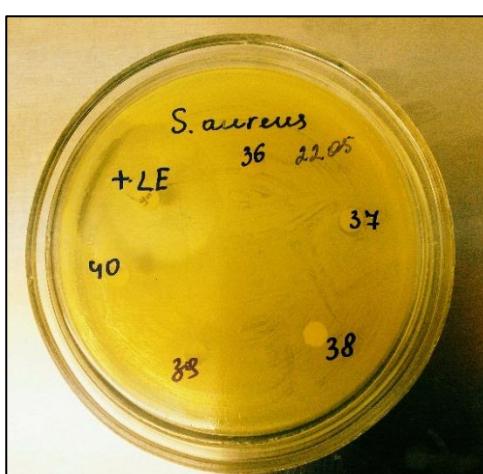


Рисунок 51 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений TEV-016, TEV-3097, TEV-202, TEV-105 и SER-001 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

III. *Streptococcus oralis* №27417



Рисунок 52 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus oralis* под действием химических соединений SER-036, SER-002, SEV-196, SEV-154 и SER-043 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 53 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus oralis* под действием химических соединений SEV-206, SEV-150, SEV-226,31, SEV-182,3 и SER-066 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 54 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus oralis* под действием химических соединений SEV-151, SEV-225,22, SER-003, TEV-106 и TEV-601 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 55 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus oralis* под действием химических соединений TEV-201, SEV-158, TEV-012, TEV-240 и TEV-103 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 56 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus oralis* под действием химических соединений TEV-200, TEV-347, TEV-346, TEV-691 и TEV-362 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 57 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus oralis* под действием химических соединений TEV-006, TEV-326, TEV-104, TEV-108 и TEV-320 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 58 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus oralis* под действием химических соединений TEV-102, TEV-002, TEV-3096, TEV-3099 и TEV-016 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 59 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus oralis* под действием химических соединений TEV-016, TEV-3097, TEV-202, TEV-105 и SER-001 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

IV. *Streptococcus sobrinus* №28417

Рисунок 60 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus sobrinus* под действием химических соединений SER-036, SER-002, SEV-196, SEV-154 и SER-043 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 61 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus sobrinus* под действием химических соединений SEV-206, SEV-150, SEV-226,31, SEV-182,3 и SER-066 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 62 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus sobrinus* под действием химических соединений SEV-151, SEV-225,22, SER-003, TEV-106 и TEV-601 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 63 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus sobrinus* под действием химических соединений TEV-201, SEV-158, TEV-012, TEV-240 и TEV-103 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

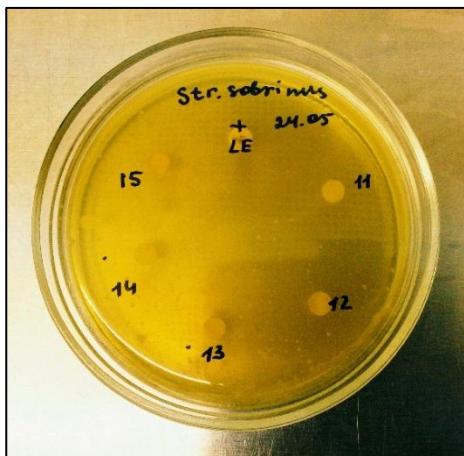


Рисунок 64 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus sobrinus* под действием химических соединений TEV-200, TEV-347, TEV-346, TEV-691 и TEV-362 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 65 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus sobrinus* под действием химических соединений TEV-006, TEV-326, TEV-104, TEV-108 и TEV-320 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 66 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus sobrinus* под действием химических соединений TEV-102, TEV-002, TEV-3096, TEV-3099 и TEV-016 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 67 – Зоны ингибирования роста колоний *Streptococcus sobrinus* под действием химических соединений TEV-016, TEV-3097, TEV-202, TEV-105 и SER-001 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

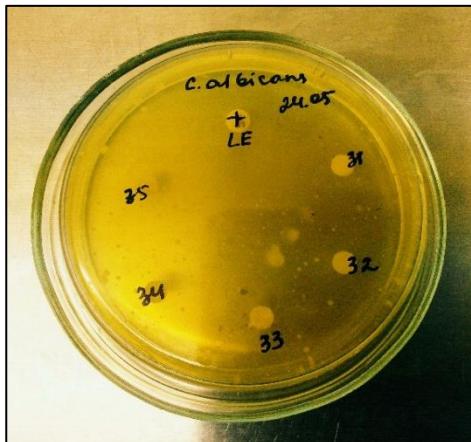
V. *Candida albicans* №24433

Рисунок 68 – Зоны ингибирования роста колоний *Candida albicans* под действием химических соединений SER-036, SER-002, SEV-196, SEV-154 и SER-043 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 69 – Зоны ингибирования роста колоний *Candida albicans* под действием химических соединений SEV-206, SEV-150, SEV-226,31, SEV-182,3 и SER-066 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

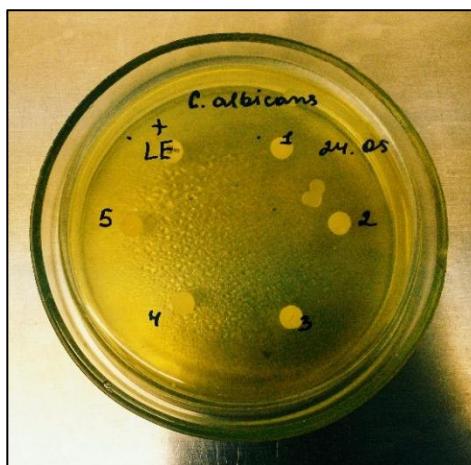


Рисунок 70 – Зоны ингибирования роста колоний *Candida albicans* под действием химических соединений SEV-151, SEV-225,22, SER-003, TEV-106 и TEV-601 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 71 – Зоны ингибирования роста колоний *Candida albicans* под действием химических соединений TEV-201, SEV-158, TEV-012, TEV-240 и TEV-103 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

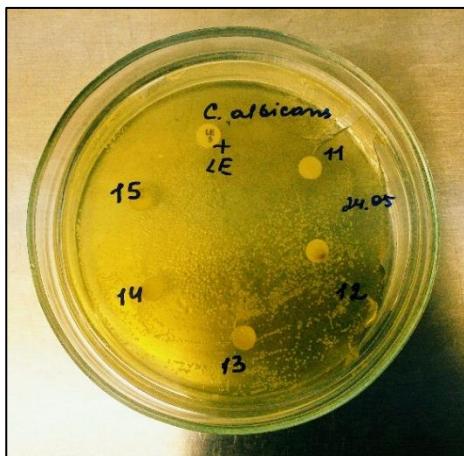


Рисунок 72 – Зоны ингибирования роста колоний *Candida albicans* под действием химических соединений TEV-200, TEV-347, TEV-346, TEV-691 и TEV-362 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

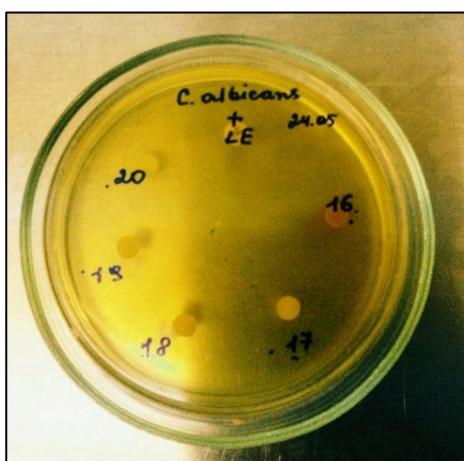


Рисунок 73 – Зоны ингибирования роста колоний *Candida albicans* под действием химических соединений TEV-006, TEV-326, TEV-104, TEV-108 и TEV-320 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 74 – Зоны ингибирования роста колоний *Candida albicans* под действием химических соединений TEV-102, TEV-002, TEV-3096, TEV-3099 и TEV-016 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)



Рисунок 75 – Зоны ингибирования роста колоний *Candida albicans* под действием химических соединений TEV-016, TEV-3097, TEV-202, TEV-105 и SER-001 на питательной среде АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала)

## ВЫВОДЫ

1. Представители рода *Streptococcus* входят в состав пародонтальных комплексов, обуславливающих воспалительно-деструктивные процессы в тканях пародонта, и соответственно являются предикторами прогрессирования заболевания. Это связано с интенсивным ростом и размножением бактерий в пародонтальных карманах при развитии воспалительных процессов.

2. Выделенные чистые культуры штаммов бактерий рода *Streptococcus* (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus*) позволяют проводить испытания новых антибактериальных препаратов в отношении патогенной микрофлоры при пародонтите.

3. Оценка antimикробной активности растительных экстрактов в отношении условно-патогенных микроорганизмов показала, что экстракты травы тысячелистника (herba *Millefolii*), цветков календулы (flores *Calendulae*) аптечного препарата - 10% настойкой прополиса и смеси экстрактов травы тысячелистника (herba *Millefolii*), цветков календулы (flores *Calendulae*) и 10% настойки прополиса подавляют рост условно-патогенных микроорганизмов *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis*.

4. Оценка противомикробной активности химических соединений в отношении условно-патогенных микроорганизмов показала, что данные соединения подавляют рост таких условно-патогенных микроорганизмов как *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis*.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Беляков В.Д., Литвин В.Ю., Емельченко Е.Н. Пушкарева В.И. Патогенные бактерии, общие для человека и животных. Патогенные бактерии в сообществах. М., 1994, С. 11-23.
2. Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Сапрофиты медицинского значения и природа их полипатогенности (на примере псевдомонад). Экология возбудителей сапронозов. М., 1988. - 3-20 с.
3. Беляков В.Д., Ходырев А.П., Тополян А.А. Стрептококковая инфекция. Л., 1978. – 69-77 с.
4. Беляков В.Д. Яфаев Р.Х. Эпидемиология. М.: Медицина, 1989, - 416 с.
5. Брико Н.И., Ешина А.С., Ряпис Л.А. Лабораторная диагностика стрептококковых инфекций. М.: Хризостом, 2000, - 64 с.
6. Брико М., Ешина А.С., Ряпис Л.А. и др. Выделение и идентификация стрептококков. М., 2002. – 68-100 с.
7. Грудянов А.И. Пародонтология. Избранные лекции.- М.: ОАО «Стоматология», 1997. - 32 с.
8. Канканян А.П., Леонтьев В.К. Болезни пародонта: Новые подходы в этиологии, патогенезе, диагностике, профилактике и лечении/.- Ер.: Тигран Мец, 1998. - 360 с.
9. Куракина Н.В., Кутепова Т.Ф. Заболевания пародонта.- М.: Медицинская книга, Н.Новгород: Издательство НГМА, 2000. - 162 с.
10. Покровский В.И., Поздеев О.К. (ред.) Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР – Медицина, 1998. – 1200 с.
11. Ряпис Л.А., Брико Н.И. Классификация стрептококков и стрептококковых инфекций человека. Ж. Микробиол. 2000. – №2. – 74-79 с.

12. Ряпис Л.А., Липницкий А.В. Микробиологическое и популяционно-генетические аспекты патогенности бактерий. Ж. микробиол., 1998. - №6. – 109-113 с.
13. Севостьянова Е.В., Ряпис Л.А. Экология *Salmonella typhi* и ее связь с проявлениями брюшнотифозной инфекции. Ж. микробиол., 1999. – 93-98 с.
14. Черкасский Б.Л. Руководство по общей эпидемиологии. М.: Медицина, 2001. – 560 с.
15. Цепов Л.М. Генерализованный пародонтит: этиология, патогенез, клинические взаимосвязи и комплексная терапия.- Смоленск, 1994.-149 с.
16. Цепов Л.М., Николаев А.И. Диагностика и лечение заболеваний пародонта - Смоленск: СГМА, 1997. - 170 с.
17. Aaltonen A.S., Tenovuo J. Association between salivary level of infection with *Streptococcus mutans*/Lactobacilli and caries-risk factors in mothers // European Journal of Paediatric Dentistry. – 2016. – V.17. – P. 375-387.
18. Aliasghari A., Rabbani Khorasgani M., Vaezifar S, Evaluation of antibacterial efficiency of chitosan and chitosan nanoparticles on cariogenic Streptococci: an in vitro study // Iranian Journal of Microbiology. – 2016. – V.8. – P.1-7.
19. Baca P., Castillo A.M., Liébana V.J. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* detection by Polymerase Chain Reaction and their relation to dental caries in 12 and 15 year-old schoolchildren in Valencia (Spain) // Medicina oral, patología oral y cirugía bucal. – 2013. – V.18. – P. 2-6.
20. Conrads G., Barth S., Möckel M. *Streptococcus tigurinus* is frequent among gtfR -negative *Streptococcus oralis* isolates and in the human oral cavity, but highly virulent strains are uncommon Article (PDF Available) in Journal of Oral Microbiology. – 2017. – V. 9. – P. 4-6.

21. De Stoppelaar J. D., Van Houte J., and De Moor C. E. Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus colonization and caries experience in 3- and 5-year-old Thai children Clinical Oral Investigations. – 2015. – V.4. – P. 23-32.
22. Demina R. Oral Streptococci in Polish Children from High Caries Risk Group Conference Paper. – 2009. – V.9 – P. 60-65.
23. Dent. J. Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in plaque of Mongolian children Conference Paper. January 2008 // Conference: IADR/AADR/CADR General Session and Exhibition. – 2008. – V.14 – P. 124-130.
24. Fekrazad R., Seraj B., Chiniforush N. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on the counts of salivary Streptococcus mutans in children with severe early childhood caries March 2017// Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2017. – V.3. – P.18-38.
25. Fives-Taylor, P. M., Macrina, F. L., Isolation of Bacteria Lytic against Streptococcus sanguis ATCC 10558 from Human Dental Plaque Caries Research. -1987. – V. 21. – P.85-92.
26. Franco E., Amoroso T.C., Marin P., Quantitative real-time polymerase chain reaction for Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in dental plaque samples and its association with early childhood caries // International Journal of Paediatric Dentistry. – 2009. – V.19. – V.1-7.
27. Hirose H., Hirose K., Isogai E., Protective efficacy of a new fusion anti-caries DNA vaccine encoding antigens of both Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus // Zhonghua yi xue za zhi. – 2009. – V.89. – V.86-91.
28. Hirose H., Hirose K., Isogai E., Close Association between Streptococcus sobrinus in the Saliva of Young Children and Smooth-Surface Caries Increment Caries Research. – 1993. – V. 27. – P.2-7.
29. Hoover C I., Newbrun E. The relationship between Streptococcus sobrinus and rampant caries in children // Shanghai kou qiang yi xue = Shanghai journal of stomatology. – 2013. – V.22. – P.432-437.

30. Ikeno K., Ikeno T., Miyazawa C. Therapeutic Potential of Propolis From Different Origin in Dental Caries July 2010 // IADR General Session. – 2010. – V.10. – P. 20-30.
31. Jenkinson H. F., Lala H. C., Shepherd M. G., Adsorption of Lysozyme from Human Whole Saliva by Streptococcus sanguis 903 and Other Oral Microorganisms Infection and Immunity. – 1982. – V. 36. – P.48-59.
32. Klinke T. Polymerase Chain Reaction for detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in dental plaque of children from Cartagena, Colombia Colombia Medica Colomb. Med.(Colomb. Med.). – 2011. – V. 37. – P. 11-16.
33. Lakshmi T, Aravindkumar S, Invitro antibacterial activity of acacia catechu ethanolic leaf extract against selected acidogenic oral bacteria // Research Journal of Pharmacy and Technology. – 2012. – V. 5. – P.333-336.
34. Landgren M. et al Root Caries and Some Related Factors in 88-Year-Old Carriers and Non-Carriers of Streptococcus sobrinus in Saliva Caries Research. – 1998. – V. 32. – P.3-9.
35. Leung V.W., Darvell B.W. In Vitro Study of Antibacterial Properties of Dental Restorative Materials towards Streptococcus sobrinus and Lactobacillus saliva...August 2013 // International Medical Journal. – 1994. – V.19. – P.473-475.
36. Loesche, W.J. Phytochemical Analysis of Plectranthus sp. Extracts and Application in Inhibition of Dental Bacteria, Streptococcus sobrinus and Streptococcus mutans Article. – 2014. – V.20. – P.31-37.
37. Loesche W. J., Rowan J., Straffon L. H. Assessment of Streptococcus mutans in healthy versus gingivitis and chronic periodontitis: A clinico-microbiological study. – 2016. – V.16. – P.529-534.
38. Mayer M.P., Pontes P., Pignatari, A.C., Genetic diversity of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in 3–4 year-old children with severe caries or without caries // International Journal of Paediatric Dentistry. – 2011. – V. 21. – P.22-31.

39. Miura H., Ueda I., Frequency of dental caries in active and inactive systemic lupus erythematosus patients: Salivary and bacterial factors Lupus. – 2016. – V. 25. – P. 145-154.
40. Niu Y., Sun J., Fan M., Protective efficacy of a new fusion anti-caries DNA vaccine encoding antigens of both Streptococcus mutatis and Streptococcus sobrinus. – 2009. – V.10. – P. 91-109.
41. Nurelhuda NM., Al-Haroni M., Trovik TA., Bakken V. Caries Experience and Quantification of Streptococcus mutans and Streptococcus Sobrinus in Saliva of Sudanese Schoolchildren Caries Research. – 2010. – V. 23. – P. 20-30.
42. Oda Y., Hayashi F., Okada M. Five-year longitudinal study of dental caries risk associated with Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in individuals with intellectual disabilities. – 2016. – V.59. P. 297-303.
43. Oda Y., Hayashi F., Okada M. Longitudinal study of dental caries incidence associated with Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in patients with intellectual disabilities BMC Oral Health. – 2015. – V.15. – P.102-106.
44. Oda Y., Hayashi F., Okada M. Penetration of Streptococcus sobrinus and Streptococcus sanguinis into dental enamel Anaerobe 35(Pt A). – 2015. – V.23. – P. 44-55.
45. Oho T., Yamashita Y., Shimazaki Y., AP-PCR detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in caries-free and caries-active subjects Molecular and Cellular Biochemistry. – 2012. –V.65. P.59-64.
46. Okada M., Kawamura M., Oda Y., Caries prevalence associated with Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in Japanese schoolchildren International Journal of Paediatric Dentistry. – 2012. – V.22. –P.2-8.
47. Okada M., Soda Y., Hayashi F., PCR detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in plaque samples from Mongolian mother-child pairs // Pediatric Dental Journal. – 2011. – V.21. P.11-13.

48. Parolia A., Thomas MS., Kundabala M. Genotypic diversity and virulence traits of streptococcus sobrinus isolated from caries-free children and children suffering severe early childhood caries // The Chinese journal of dental research: the official journal of the Scientific Section of the Chinese Stomatological Association (CSA). – 2013. – V.16. – P.3-9.
49. Pritchard T. J., and Peene S. S. The effect of fluoride on adhesion of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis on the dental pure titanium surface. – 2015. – V.55. –P.106-126.
50. Pushparaj A., Raubbin R.S. and Balasankar T., Antibacterial Activity of Bioactive Glasses against Oral Bacteria Conference Paper. – 2014. – V.14. P.45-50.
51. Salman HA., Senthikumar R., Identification and Antibiogram Profile of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus from Dental Caries Subjects // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2015. – V.5. – P.54-57.
52. Soni H., Vasavada M. Prevalence of streptococcus mutans and streptococcus sobrinus in children with mixed dentition Article. – 2007. – V.23. –P.130-145.
53. Tarasova AS., Stom DI., Kudryasheva NS., Real-time monitoring of cariogenic bacteria via bioluminescent imaging: A biodontic hypothesis // Dental Hypotheses. – 2016. – V.7. – P.12.
54. Teti G., Mazzotti G., Zago M et al. Pleurocidin congeners demonstrate activity against Streptococcus and low toxicity on gingival fibroblasts Archives of oral biology. – 2016. – V. 70. – P.76-77.
55. Vaezifar S., Rahimi F., Younesi H. Association of streptococcus mutants and streptococcus Sanguis in act of dental caries. – 2015. – V.45. – P.100.
56. Weinberger SJ, Wright GZ. Effect of Herbal and Fluoride Mouth Rinses on Streptococcus mutans and Dental Caries among 12–15-Year-Old School Children: A Randomized Controlled Trial International Journal of Dentistry. – 2017. – V. 33. – P.67-79.

57. Streptococcus sobrinus and Streptococcus mutans in a Longitudinal Study of Dental Caries Microbial Ecology in Health and Disease. – 2009. – V. 6. – P.237-243.
58. Immunoelectron Microscopic Identification and Localization of *Streptococcus sanguis* with Peroxidase-Labeled Antibody: Localization of *Streptococcus sanguis* in Intact Dental Plaque Infection and Immunity. – 1975. – V. 11. – P. 23-24.
59. Chen C.C., Teng L.J., Chang T.C. Identification of clinical relevant viridans group streptococci by sequence analysis of the ribosomal DNA spacer region // J. Clin. Microbiol. 2004, v. 42, №6, p.2651-265.
60. Facklam R. What happened to the *Streptococcus*: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin. Microbiol. Rev., 2002. – V.15. – N 4. – P.613-630.
61. Kalia A., Enright M.C., Spratt B.C. et al. Directional gene movement from human-pathogenic to commensal-like Streptococci. Inf. Immun., 2001. – V. 69. – P. 4858-4869.
62. Lomholt H. Evidence of recombination and an antigenically diverse immunoglobulin A1 protease among strains of *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun., 1995. – V. 63. – P. 4238-4243.
63. Lyytikainen O., Rautio M., Carlson P et al. Nosocomial bloodstream infections due to viridans streptococcus in haematological and non-haematological patients: species distribution and antimicrobial resistance. // J. Antimicrob. Chemother., 2004. – V. 53. – P. 631-634.
64. Wisplinghoff H., Reiners R.R., Cornely O., Seifert H. Molecular relationships and antimicrobial susceptibilities of viridans group streptococcus isolated from blood of neutropenic cancer patients. // J. Clin Microbiol., 1999. – V. 37. – N 6. – P.1876-1880.
65. Woo P.Y., Fung A.M. Lau S.K.P. Group G beta-hemolytic streptococcal bacteremia characterized by 16S ribosomal RNA gene sequencing. // J. Clin Microbiol., 2001. – V. 39. – N 9. – P.3147-3155.

66. Zaoutis T., Schneider B., Moore L.S., Klein J.D. Antibiotic susceptibilities of group C and Group streptococcus, isolated from patients with invasive infections: evidence of vancomycin tolerance among group G serotypes. *J. Clin Microb.*, 1999, - V.37, - N.10. – P.3380-3383.

## ОТЗЫВ

научного руководителя на выпускную квалификационную (дипломную) работу студента 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. – «Биология» медико-профилактического факультета с отделением микробиологии

**Рыскуловой Гузель Мансуровны**

на тему «Формирование коллекции клинических штаммов микроорганизмов, ассоциируемых с патологией пародонта».

Студентка Рыскулова Г.М. проходила практику в ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии. За время своей работы в лаборатории она показала себя как компетентный, грамотный и организованный студент, подготовленный к проведению научных исследований.

Дипломная работа Рыскуловой Г.М. посвящена формированию коллекции клинических штаммов микроорганизмов, ассоциируемых с патологией пародонта. В процессе работы над дипломной работой Рыскулова Г.М. изучила большой объем отечественной и зарубежной научной литературы, овладела методиками выделения чистых культур пародонтопатогенных микроорганизмов, молекулярно-генетической и масс-спектрометрической идентификации выделенных штаммов бактерий, методикой длительного хранения чистых культур, а также определения антибиотикочувствительности данных культур.

Результаты проведенных исследований были опубликованы в научном журнале «Стоматология» (Москва, 2017 г.), рекомендованного ВАК Минздрава России, а также в сборнике материалов 82-ой Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2017 г.).

Дипломная работа Рыскуловой Г.М. выполнена полностью в соответствии с предъявляемыми требованиями, рекомендована к защите.

Научный руководитель:  
д.м.н., профессор

А.Р. Мавзутов

Научный консультант:  
стажер-исследователь

К.Ю. Швец

«23» июня 2017 г.

## РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную (дипломную) работу студента 4 курса медико-профилактического факультета с отделением микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России **Рыскуловой Гузель Мансуровны**, обучавшейся по направлению подготовки 06.03.01. – «Биология»

На рецензию представлена дипломная работа на тему: «Формирование коллекции клинических штаммов микроорганизмов, ассоциируемых с патологией пародонта». Актуальность данной работы не вызывает сомнения, поскольку распространенность заболеваний пародонта с каждым годом только увеличивается и представляет серьезную проблему в современной стоматологии в связи с наличием клинических форм, приводящих к разрушению зубочелюстной системы и высокой вероятности возникновения рецидивов заболевания.

Рыскуловой Г.М. обработано достаточно большое количество научного материала, на высоком теоретическом и методологическом уровне проведено исследование особенностей выделения чистых культур пародонтопатогенных микроорганизмов, ассоциируемых с воспалительно-деструктивными процессами в тканях пародонта, молекулярно-генетической и масс-спектрометрической идентификации выделенных штаммов бактерий, длительного хранения чистых культур в обогащенных питательных средах, а также определения антибиотикочувствительности данных культур

Автор выпускной квалификационной работы показал отличный уровень владения теоретическими положениями по выбранной теме исследования, показал способность формулировать собственную точку зрения (теоретическую позицию) на основе анализа результатов исследований разных ученых в этой области. Сформулированные в работе выводы достаточно обоснованы и могут быть использованы в практической деятельности. Существенных недостатков в дипломной работе не выявлено.

Дипломная работа Рыскуловой Г.М. выполнена полностью в соответствии с предъявляемыми требованиями, рекомендована к защите и заслуживает оценки «отлично».

д.б.н., профессор кафедры фундаментальной  
и прикладной микробиологии  
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

 Ал.Х. Баймиеv

«23» июня 2017 г.

## РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную (дипломную) работу студента 4 курса медико-профилактического факультета с отделением микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России **Рыскуловой Гузель Мансуровны**, обучавшейся по направлению подготовки 06.03.01. – «Биология»

Дипломная работа «Формирование коллекции клинических штаммов микроорганизмов, ассоциируемых с патологией пародонта» Рыскуловой Г.М. выполнена на актуальную в настоящее время тему, поскольку воспалительные заболевания пародонта имеют высокую распространенность среди населения и представляют серьезную проблему.

Автором проведена экспериментальная работа по формированию коллекции клинических штаммов микроорганизмов, ассоциируемых с патологией пародонта, которая имеет практическую ценность для разработки новых способов диагностики и лечения пародонтита. Рыскуловой Г.М. обработан значительный объём литературных данных, что позволило провести исследования на высоком теоретическом и методологическом уровне. Материал изложен научным языком, все разделы работы логически выстроены и взаимосвязаны.

Автором при написании дипломной работы сохранена традиционная структура, а именно в ней представлены разделы введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, представление собственных данных и их обсуждения, заключение, выводы, список цитируемой литературы, приложения. Сформулированные в работе выводы достаточно обоснованы и могут быть использованы в практической деятельности.

Дипломная работа Рыскуловой Г.М. выполнена в соответствии с предъявляемыми требованиями, рекомендована к защите и заслуживает оценки «отлично».

д.б.н., профессор кафедры биохимии и  
биотехнологии ФГБОУ ВО БашГУ  
Минобрнауки России



Р.И. Ибрагимов

*«23» июня* 2017 г.

**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.  
Данный отчет не подлежит использованию в коммерческих целях.

**Отчет о проверке на заимствования №1**

Дата выгрузки: 23.06.2017 10:32:24

Автор: Кобзева Наталья Рудольфовна [nrkob@mail.ru](mailto:nrkob@mail.ru) / ID: 5Проверяющий: Кобзева Наталья Рудольфовна ([nrkob@mail.ru](mailto:nrkob@mail.ru) / ID: 5)

Организация: Башкирский государственный медицинский университет

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://bashgmu.antiplagiat.ru>**ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ**

№ документа: 1884

Имя исходного файла: Рыскулова Г.М.

Диплом\_«антиплагиат»

Размер текста: 108 кб

Символов в тексте: 82062

Слов в тексте: 9710

Число предложений: 676

**ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ**

Отчет от 23.06.2017 10:32:27 - Последний готовый отчет (ред.)

Комментарии: не указано

Модули поиска:

ЗАИМСТВОВАНИЯ

29.01%

ЦИТИРОВАНИЯ

0%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

70.99%



№	Заимств.	Источник	Ссылка	Загрузка	Модуль поиска
[01]	10.92%	скачать	<a href="http://bibcorardocs.org">http://bibcorardocs.org</a>	15 Фев 2017	Модуль поиска Интернет
[02]	9.43%	Пародонтологическая азбука. Феди - Стр 3	<a href="http://studfiles.ru">http://studfiles.ru</a>	29 Июл 2016	Модуль поиска Интернет
[03]	1.85%	Матвеев, Андрей Валерьевич диссертация ... кандидата ветеринарных наук: ...	<a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[04]	1.78%	209196	<a href="http://Biblioclub.ru">http://Biblioclub.ru</a>	18 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"
[05]	1.78%	№4	<a href="http://elvuz.rpnzgu.ru">http://elvuz.rpnzgu.ru</a>	раньше 2011	Модуль поиска Интернет
[06]	1.69%	ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ - Стр 7	<a href="http://studfiles.ru">http://studfiles.ru</a>	27 Июл 2016	Модуль поиска Интернет
[07]	1.47%	ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ - Стр 8	<a href="http://studfiles.ru">http://studfiles.ru</a>	27 Июл 2016	Модуль поиска Интернет
[08]	1.42%	Columbia Blood Agar Base / (with 1% Agar)	<a href="http://vbibl.ru">http://vbibl.ru</a>	06 Июл 2013	Модуль поиска Интернет
[09]	1.31%	ТППиПКП 2013 Руденко "Общая биология и микробиология"	не указано	18 Фев 2014	Кольцо вузов
[10]	1.31%	ТППиПКП 2013 Руденко "Микробиология (для спец. 100800 «Товароведение»)"	не указано	18 Фев 2014	Кольцо вузов
[11]	1.31%	ТППиПКП 2013 Руденко "Микробиология (для спец. 260100 «Продукты питания...")	не указано	18 Фев 2014	Кольцо вузов
[12]	1.26%	Пародонтологическая азбука. Феди - Стр 2	<a href="http://studfiles.ru">http://studfiles.ru</a>	29 Июл 2016	Модуль поиска Интернет
[13]	1.11%	Особенности эпидемиологии и патогенеза заболеваний пародонта (Обзор л...	<a href="http://ktzu.edu.kg">http://ktzu.edu.kg</a>	10 Фев 2016	Модуль поиска Интернет
[14]	0.94%	1.Общая характеристика микроорганизмов..txt	не указано	06 Мая 2016	Кольцо вузов
[15]	0.94%	План1.Общая характеристика микроорганизмов..txt	не указано	20 Мая 2016	Кольцо вузов
[16]	0.94%	План1.Общая характеристика микроорганизмов..txt	не указано	20 Мая 2016	Кольцо вузов
[17]	0.94%	Министерство образования и науки Российской Федерации.txt	не указано	26 Мая 2016	Кольцо вузов
[18]	0.94%	МИКРООРГАНИЗМЫ ХОЛОДИЛЬНЫХ КАМЕР	не указано	04 Июл 2016	Кольцо вузов
[19]	0.92%	gorbunovaev.doc	не указано	25 Фев 2013	Кольцо вузов
[20]	0.86%	Министерство образования и науки Российской Федерации.txt	не указано	20 Июн 2016	Кольцо вузов
[21]	0.82%	Поиск веществ с противомикробной активностью среди производных антра...	<a href="http://dbslib.net">http://dbslib.net</a>	раньше 2011	Модуль поиска Интернет
[22]	0.81%	«Молекулярно-биологическая характеристика и совершенствование иденти...	<a href="http://microbe.ru">http://microbe.ru</a>	11 Дек 2016	Модуль поиска Интернет
[23]	0.79%	Пустынкова, Светлана Владимировна диссертация ... кандидата медицински...	<a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[24]	0.79%	Клиничко-иммунологические особенности и иммунокорригирующая терапии...	<a href="http://dbslib.net">http://dbslib.net</a>	01 Июл 2016	Модуль поиска Интернет
[25]	0.77%	Гингивит. Классификация, этиология, патогенез. План изучения темы: Mеха...	<a href="http://tfol.o.ru">http://tfol.o.ru</a>	14 Янв 2017	Модуль поиска Интернет

[26]	0.71%	Министерство образования и науки Российской Федерации.txt	не указано	26 Мая 2016	Кольцо вузов
[27]	0.7%	4126	<a href="http://e-lanbook.com">http://e-lanbook.com</a>	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[28]	0.69%	Текст диссертации (2/5)	<a href="http://itsmo.ru">http://itsmo.ru</a>	21 Окт 2014	Модуль поиска Интернет
[29]	0.67%	Проблемы особо опасных инфекций - Спицын А.Н.	<a href="http://journal.microbe.ru">http://journal.microbe.ru</a>	09 Сен 2016	Модуль поиска Интернет
[30]	0.66%	58333	<a href="http://e-lanbook.com">http://e-lanbook.com</a>	09 Mar 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[31]	0.66%	Дубровина, Светлана Сергеевна диссертация ... кандидата фармацевтических...	<a href="http://dlib.slu.ru">http://dlib.slu.ru</a>	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[32]	0.61%	грудионов а.и. заболевания пародонта. 2009.djvu	<a href="http://internet.lib.rsl.ru">http://internet.lib.rsl.ru</a>	22 Апр 2014	Модуль поиска Интернет
[33]	0.5%	NYrnnik_8869. Швец Ксения Юрьевна. РАЗРАБОТКА СПОСОБА РАННЕЙ ДИАГН...	<a href="http://umilk.fasie.ru">http://umilk.fasie.ru</a>	04 May 2017	Кольцо вузов
[34]	0.49%	Золотухин, Дмитрий Сергеевич диссертация ... кандидата биологических наук...	<a href="http://dlib.slu.ru">http://dlib.slu.ru</a>	25 Дек 2015	Коллекция диссертаций РГБ
[35]	0.46%	Мальцева, Галина Семеновна диссертация ... доктора медицинских наук : 14....	<a href="http://dlib.slu.ru">http://dlib.slu.ru</a>	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[36]	0.45%	Салем, Рамин диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.00.21 Москва 2...	<a href="http://dlib.slu.ru">http://dlib.slu.ru</a>	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[37]	0.41%	Исаева, Гузель Шавхатовна диссертация ... доктора медицинских наук : 03.02...	<a href="http://dlib.slu.ru">http://dlib.slu.ru</a>	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[38]	0.4%	Гусейнзаде, Махаббат Исмаиловна диссертация ... кандидата медицинских на...	<a href="http://elibs.slu.ru">http://elibs.slu.ru</a>	27 Дек 2015	Коллекция диссертаций РГБ
[39]	0.39%	Скачать в Pdf	<a href="https://mediasphere.ru">https://mediasphere.ru</a>	11 Янв 2017	Модуль поиска Интернет
[40]	0.38%	Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции	не указано	25 Апр 2013	Кольцо вузов
[41]	0.37%	Коровкина, Анна Николаевна диссертация ... кандидата медицинских наук : 1...	<a href="http://dlib.slu.ru">http://dlib.slu.ru</a>	27 Дек 2015	Коллекция диссертаций РГБ
[42]	0.36%	Лазарихина, Наталья Михайловна диссертация ... кандидата медицинских на...	<a href="http://dlib.slu.ru">http://dlib.slu.ru</a>	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[43]	0.36%	Применение эрбиевого лазера для хирургического лечения пародонтита	<a href="http://dslib.net">http://dslib.net</a>	02 Июл 2016	Модуль поиска Интернет
[44]	0.34%	батагова биол.docx	не указано	25 Июн 2015	Кольцо вузов
[45]	0.34%	Ведешина, Эрнесса Григорьевна диссертация ... кандидата медицинских наук.	<a href="http://dlib.slu.ru">http://dlib.slu.ru</a>	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[46]	0.33%	ДиссерЛ	не указано	08 Фев 2013	Модуль поиска "БГМУ"
[47]	0.32%	ref_Nemchenko.rar (3/6)	<a href="http://nztroideku.ru">http://nztroideku.ru</a>	30 Янв 2015	Модуль поиска Интернет
[48]	0.19%	Халин, Денис Анатольевич диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.0...	<a href="http://dlib.slu.ru">http://dlib.slu.ru</a>	20 Янв 2010	Коллекция диссертаций РГБ
[49]	0.18%	Новикова, Анна Сергеевна диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.0...	<a href="http://dlib.slu.ru">http://dlib.slu.ru</a>	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[50]	0.17%	Сидоренко Анастасия Дмитриевна Kursovoy_proekt 4 GOTOVO.docx	не указано	05 Мая 2017	Кольцо вузов
[51]	0.16%	Фирсова, Татьяна Евгеньевна диссертация ... кандидата ветеринарных наук : ...	<a href="http://elibs.slu.ru">http://elibs.slu.ru</a>	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[52]	0.14%	Мартиросян, Варвара Георгиевна диссертация ... кандидата медицинских наук.	<a href="http://dlib.slu.ru">http://dlib.slu.ru</a>	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[53]	0.14%	Современные научноемкие технологии. № 5, 2014, Часть 1	<a href="http://bibliocessica.com">http://bibliocessica.com</a>	26 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"
[54]	0.13%	Терапевтическая стоматология	<a href="http://ibooks.ru">http://ibooks.ru</a>	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбуks"
[55]	0.13%	ПРИКАЗ МИНЗДРАВА СССР ОТ 22_04_1985 N 535	<a href="http://worklib.ru">http://worklib.ru</a>	25 Фев 2017	Модуль поиска Интернет
[56]	0.13%	65693	<a href="http://e-lanbook.com">http://e-lanbook.com</a>	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[57]	0.12%	247001	<a href="http://e-lanbook.com">http://e-lanbook.com</a>	10 Mar 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[58]	0.11%	TPU_VKR_26072.pdf	<a href="http://portal.tpu.ru">http://portal.tpu.ru</a>	03 Июн 2016	Кольцо вузов
[59]	0.11%	157874	<a href="http://e-lanbook.com">http://e-lanbook.com</a>	10 Mar 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[60]	0.11%	Разина	не указано	10 Ноя 2015	Кольцо вузов
[61]	0.11%	Григорович	не указано	05 Мая 2016	Кольцо вузов
[62]	0.11%	Разина без списка	не указано	10 Ноя 2015	Кольцо вузов
[63]	0.09%	64323	<a href="http://e-lanbook.com">http://e-lanbook.com</a>	09 Mar 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[64]	0.09%	Федотчева, Татьяна Александровна диссертация ... доктора медицинских наук...	<a href="http://dlib.slu.ru">http://dlib.slu.ru</a>	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[65]	0.09%	Ботина, Светлана Геннадиевна диссертация ... доктора биологических наук: ...	<a href="http://dlib.slu.ru">http://dlib.slu.ru</a>	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[66]	0.08%	2015_240700_zudina_anastasiya_vladimirovna.docx	не указано	17 Июн 2015	Кольцо вузов



23.06.2017 *(Handwritten signature)*