

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



Сунгатуллина Гульнара Энверовна

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИНФОРМАТИВНОСТИ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ И MALDI-TOF МАСС-
СПЕКТРОМЕТРИИ ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
РОДОВ *LACTOBACILLUS* И *BIFIDOBACTERIUM*

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор



А.Р. Мавзютов

Научный консультант:



А.В. Цветкова

Уфа–2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	3
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. <i>Lactobacillus</i>	8
1.2. <i>Bifidobacterium</i>	15
1.3. Полимеразная цепная реакция	19
1.4. Масс-спектрометрия MALDI-TOF	30
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1. Бактериальные штаммы	37
2.2. Питательные среды и культивирование	44
2.2.1. Посев <i>Lactobacillus</i>	44
2.2.2. Посев <i>Bifidobacterium</i>	45
2.2.3. Создание анаэробных условий	48
2.3. Определение фенотипических признаков	48
2.3.1. Окраска по Граму	48
2.3.1. Биохимические тесты	50
2.4. ПЦР- анализ	55
2.5. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ	58
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	61
3.1. Идентификация видов <i>Lactobacillus spp.</i> и <i>Bifidobacterium spp.</i> традиционными биохимическими методами	61
3.2. Идентификация <i>Lactobacillus spp.</i> и <i>Bifidobacterium spp.</i> с помощью ПЦР-анализа	73
3.3. Идентификация <i>Lactobacillus spp.</i> и <i>Bifidobacterium spp.</i> методом MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	80
ВЫВОДЫ	84
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	85
ПРИЛОЖЕНИЕ	94

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БАД – биологически активные добавки

ББП – бактериальные биологические препараты

БВ – бактериальный вагиноз

БП - биопленка

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КА – кровяной агар

КОЕ – колониеобразующая единица

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МСА – молочно-солевой агар

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

УПМ – условно-патогенный микроорганизм

MALDI-TOF - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of flight

MS – Mass Spectrometry

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Актуальным вопросом в микробиологии на сегодняшний день является поиск новых штаммов бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* для создания современных пробиотических препаратов и продуктов функционального питания, что обусловлено широчайшим спектром полезных свойств этих микроорганизмов. Поэтому быстрая и точная идентификация данных микроорганизмов является востребованной задачей как научного, так и прикладного характера [Салгина А.В., Бондаренко Т.А., 2014].

Представители родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* являются компонентами естественной микрофлоры организма человека и играют важную роль в поддержании здоровья: обеспечивают защиту эпителиальных клеток от повреждения, регуляцию липидного обмена, стимуляцию кишечного ангиогенеза, а также выполняют антитоксическую функцию, поддерживают оптимальный уровень метаболических и ферментативных процессов, иммунного статуса, антимуtagenной и антиканцерогенной активности [Бондаренко В.М., 2005].

Различные виды и штаммы *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* широко используются в составе лекарств, в том числе пробиотиков, для лечения дисбактериозов разной этиологии, заболеваний полости рта, урогенитальной сферы, желудочно-кишечных расстройств, а также в составе БАДов. Пробиотические продукты оказывают благоприятное влияние на физиологические функции и биохимические реакции организма человека и животных. Их употребление способствует улучшению и нормализации различных функций и проявлению собственных защитных ресурсов организма.

До недавнего времени идентификация и подтверждение видовой принадлежности *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* осуществлялась на основе изучения морфологических, физиологических и биохимических признаков,

что не всегда эффективно, особенно при работе со смешанными культурами.

Такой подход ограничивает возможности проведения качественного и количественного анализа видового состава лакто- и бифидофлоры и не всегда позволяет эффективно отбирать безопасные и технологичные штаммы этих бактерий для использования их в качестве заквасочных культур в производстве кисломолочных продуктов и пробиотических препаратов [Кузнецова Т.В. и др., 2016].

На сегодняшний день одним из наиболее перспективных методов идентификации штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Одновременное применение нескольких методов ПЦР обеспечивает возможность генотипирования *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* и позволяет решать задачи дифференциации видов и штаммов, входящих в состав пробиотических и производственных заквасок [Кузнецова Т.В. и др., 2016].

Также, в настоящее время, на замену традиционным методам идентификации микроорганизмов приходят экспресс-методы, основанные на физико-химических методах анализа состава микробной клетки и продуктов ее метаболизма. Таким методом является метод матрично-ассоциированной десорбции/ионизации (МАЛДИ), который в комплексе с времяпролетной масс-спектрометрией позволяет проводить анализ сложных биоорганических молекул, в частности тяжелых, труднолетучих молекул нуклеиновых кислот и белков [Салгина А.В. и др., 2014].

Метод MALDI TOF масс-спектрометрии позволяет не только идентифицировать микроорганизм, но и в ряде случаев получать уникальный набор рибосомальных белков (фингерпринт) для каждого из исследуемых штаммов, что открывает широкие возможности и перспективы для изучения штаммовых характеристик [Точилина А.Г., Белова И.В., 2015].

Таким образом, в связи с возникновением современных, более точных методов идентификации микроорганизмов, таких как ПЦР и MALDI TOF масс-спектрометрия, возникла необходимость установить информативность

этих методов и провести их сравнительную оценку.

Цель исследования

Сравнительная оценка информативности полимеразной цепной реакции и MALDI-TOF масс-спектрометрии при идентификации представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* для разработки новых алгоритмов, позволяющих значительно сократить продолжительность исследования и оптимизировать процесс формирования коллекций, представляющих интерес для медицины и пищевой промышленности.

Задачи исследования

1. Получение чистых культур штаммов представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*;
2. Оценка эффективности использования родо- и видоспецифических праймеров для ПЦР-детекции и идентификации *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*;
3. Определение масс-спектров и анализ результативности MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа для идентификации близкородственных видов родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*;
4. Сравнительная оценка эффективности биохимического метода, ПЦР-анализа и масс-спектрометрии для дифференциации представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

Научная новизна

Показано, что классические бактериологические методы в связи с вариабельностью признаков и большим фенотипическим сходством представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* не являются достаточными для их эффективной дифференциации и идентификации, а могут быть использованы только для выделения возбудителя в чистой культуре из исследуемого материала. Поэтому для надежной и эффективной

диагностики необходимо использовать традиционные методы в сочетании с современными молекулярными (MALDI-TOF-MS и ПЦР).

Совокупность методов классической бактериологии, MALDI-TOF-MS анализа и ПЦР позволила выявить микроорганизмы родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Метод MALDI-TOF-MS оказался наиболее эффективным и достоверным способом видовой идентификации представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

На чистой культуре *Lactobacillus*- и *Bifidobacterium* показана высокая специфичность праймеров, используемых для родовой детекции *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. и межвидовой дифференциации штаммов *L. plantarum*, *L. acidophilus* и *L. rhamnosus*, а также *B. bifidum* и *B. longum*, и именно их следует использовать в дальнейшей работе по дифференциальной диагностике *Lactobacillus*- и *Bifidobacterium*.

Определены молекулярные маркеры (масс-пики) и проведена межвидовая дифференциация коллекции штаммов *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *B. bifidum* и *B. longum* с использованием метода MALDI-TOF.

Охарактеризованы штаммы *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum* и *B. longum* по широкому набору фено- и генотипических признаков.

Практическая значимость

Депонированы штаммы *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* в рабочей коллекции кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ, которые могут быть использованы в качестве тест-штаммов при создании пробиотических препаратов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. *Lactobacillus*

Lactobacillus (от лат. *lac*, *lactis* - молоко) — род грамположительных

факультативно-анаэробных, микроанаэробных, реже облигатно-анаэробных неспорообразующих молочнокислых бактерий.

Lactobacillus обычно имеют правильную форму длинной «палочки» размером 0,5-1,2х1,0-10,0 мкм, иногда встречаются изогнутые, булабовидные или кокковидные, располагаются поодиночке, попарно или в виде коротких, реже длинных цепочек. На форму микроорганизмов влияют условия роста, состав питательной среды, температурный режим и возраст культуры. В процессе своего нормального метаболизма *Lactobacillus* способны образовывать молочную кислоту, перекись водорода, продуцировать лизоцим и вещества с антибиотической активностью: реутерин, плантарицин, лактоцидин, лактолин. Гетероферментативные виды *Lactobacillus* в качестве конечных продуктов, кроме того, могут продуцировать уксусную кислоту и углекислый газ.

По современной систематике бактерии рода *Lactobacillus* относятся к Империи *Caryotes*, Надцарству *Procaryotes*, Царству *Bacteria*, Отделу *Firmicutes*, Классу *Bacilli*, Порядку *Lactobacillales*, Семейству *Lactobacillaceae*, Роду *Lactobacillus*. [Соловьева И.В. и др., 2014].

На данный момент известно около 130 видов *Lactobacillus* [Новокшенов А.А., Соколова Н.В., 2012]. Наиболее распространенными являются сырная палочка (*Lactobacillus casei*), ацидофильная *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus*), дельбрюковская палочка (*Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*), болгарская *Lactobacillus* (*Lactobacillus bulgaricus*) и молочнокислая палочка (*Lactobacillus plantarum*). Кроме отдельных видов, существует еще множество штаммов (генетических подвидов), которые обозначаются, согласно международной классификации, идущими после видового названия заглавными буквами и набором цифр. Например, штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC 11842 содержит 2217 генов, а *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* штамма ATCC BAA-365 включает 2040 генов. Название вышеприведенных *Lactobacillus* состоит из названия рода (*Lactobacillus*), вида (*delbrueckii*), подвида (*bulgaricus*) и названия штамма

(ATCC...).

Ученые продолжают работать с геномом *Lactobacillus*, стремясь усилить и улучшить их полезные свойства, поэтому новые штаммы появляются ежегодно в огромных количествах.

Lactobacillus широко распространены в окружающей среде. Они встречаются в почве, эпифитной микрофлоре, различных биотопах организма человека и животных, Это те экологические ниши, в которых удовлетворяются их потребности в дефиците кислорода, высокой концентрации питательных веществ, ростовых факторах (растворимых углеводах, белковых продуктах распада, витаминов) [Соловьева И.В. и др., 2014]. Широкое распространение *Lactobacillus* и успешное освоение ими различных сред обитания объясняется кислотоустойчивостью этих бактерий и способностью продуцировать большое количество молочной кислоты, что можно рассматривать как эволюционно сложившийся механизм приспособления к выживанию в сложных условиях и конкуренции. [Ljungh A., Wadstrom T, 2009].

Согласно последним исследованиям, на растениях бактерии рода *Lactobacillus* содержатся в небольшом количестве - 10^4 – 10^5 КОЕ/мл, что составляет 0,01–1% от общего числа микроорганизмов эпифитной микрофлоры растений. [Соловьева И.В. и др., 2014].

Lactobacillus часто встречаются в почве и сточных водах. Присутствие этих микроорганизмов в почве связано с наличием растительного покрова или растительных остатков, видовой состав отражает эпифитную и ризоидную микрофлору. В сточных водах присутствует большое количество *Lactobacillus* различных видов в количестве 10^4 – 10^5 КОЕ/мл – *L. plantarum*, *L. ruminis*, *L. sharpeae*, *L. agilis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. farciminis*, *L. curvatus*, *L. sakei*, *L. salivarius* и *L. coryniformis* [Hammes W.P., Hertel C., 1992]. Многие из этих видов встречаются в фекалиях человека и животных, их присутствие в сточных водах, по-видимому, является следствием фекального загрязнения вод.

Lactobacillus входят в состав резидентной микрофлоры желудочно-кишечного и урогенитального тракта человека, в желудочно-кишечном тракте эти микроорганизмы представлены наиболее широко. Их количественное содержание в полости рта здоровых людей составляет 10^3 – 10^4 КОЕ/мл. Так, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. fermentum* и *L. salivarius* чаще всего выделяются из зубного налета и являются членами многочисленного бактериального сообщества поддесневой микрофлоры [Ботина С.Г. и др., 2010].

В желудке *Lactobacillus* обнаруживаются в количестве 10^3 КОЕ/мл, в тощей и подвздошной кишке их количество находится в пределах 10^2 – 10^5 КОЕ/мл. Количественное содержание *Lactobacillus* в фекалиях человека мало зависит от возраста и составляет в норме 10^7 – 10^8 КОЕ/мл [Глушанова Н.А., 2003].

В просвете толстой кишки здоровых взрослых людей чаще всего встречаются 14 видов *Lactobacillus* – *L. brevis* (28%), *L. plantarum* (19%), *L. acidophilus* (12%), *L. cellobiosus* (9,5%) *L. casei* (9,5%), *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. curvatus*, *L. salivarius*, *L. ruminis*, *L. johnsonii*, *L. Sakei*. [Глушанова Н.А., 2003], [Ботина С.Г. и др., 2010].

Бактерии рода *Lactobacillus* являются неотъемлемым и доминирующим компонентом микробиоценоза влагалища и составляют 95–98% от общего числа микроорганизмов [Ботина С.Г. и др., 2010]. Во влагалище обнаруживают более 10 видов *Lactobacillus*, в основном *L. crispatus* (32%), *L. jensenii* (23%), *L. gasseri* (5%), *L. fermentum* (0,3%), *L. oris* (0,3 %), *L. reuteri* (0,3%), *L. ruminis* (0,3%) и *L. vaginalis* (0,3%) [Torriani S. et. al, 1999]. Показано, что чаще всего встречается ассоциация *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* и *L. iners*, в то время как разновидности, такие как *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum* и *L. plantarum*, встречаются реже.

Lactobacillus колонизирует пристеночную зону слизистых оболочек ЖКТ и влагалища, где формируются микроколонии, образующие биопленку, находящуюся в тесной взаимосвязи с эпителиоцитами, что позволяет их

объединить в микробно-тканевые комплексы. Комплексы образуют сами микроколонии и их метаболиты, слизь (муцин), эпителиальные клетки слизистой оболочки и их гликокаликс, а также клетки стромы слизистой оболочки (фибробласты, лейкоциты, лимфоциты, нейроэндокринные клетки, клетки микроциркуляторного русла и др.) [Ljungh A., Wadstrom T., 2009].

В пределах кишечного микробно-тканевого комплекса существуют сложные трофические и регуляторные связи. Установлено, что в кишечнике существует обмен пищевыми субстратами, как между различными микроорганизмами, так и между индигенными микроорганизмами и кишечным эпителием. Так, известно, что сахаролитические анаэробные микроорганизмы в результате расщепления углеводов, а именно мукополисахаридов, продуцируемых бокаловидными клетками, и полисахаридов, поступающих с пищей, образуют короткоцепочечные жирные кислоты, которые, в свою очередь, используются эпителиоцитами в качестве важного источника энергии [Torriani S. et. al, 1999].

В микробиоценозе влагалища у здоровых женщин репродуктивного возраста преобладают пероксидпродуцирующие штаммы *Lactobacillus*. Единственным полисахаридом, доступным для потребления влагалищными *Lactobacillus*, является гликоген. Расщепляя гликоген, *Lactobacillus* производят большое количество молочной кислоты, что приводит к закислению среды до 3,8 – 4,4.

Проведенные исследования показывают, что лишь редкие штаммы *Lactobacillus* имеют способность к ферментации гликогена, но в присутствии человеческой сыворотки, содержащей гликогеназу, эта способность повышается. Возможно, большинство влагалищных *Lactobacillus* получает доступ к углеводам за счет физиологического ферментативного распада полисахарида тканями или другими организмами [Квасников Е.И., Нестеренко О.Л., 1975]. *Lactobacillus* играют важную роль в обеспечении колонизационной резистентности влагалища за счет продукции биологически активных веществ, органических кислот и бактериоцинов.

Lactobacillus обладают рядом важнейших свойств, положительно влияющих на поддержание микробного гомеостаза и активацию иммунитета:

- подавляют гнилостные и гноеродные бактерии;
- обладают антибактериальной активностью, которая связана с выработкой ими в процессе сбраживания углеводов молочной кислоты, спирта, лизоцима, реутерина, плантарицина, лактоцидина и лактолина; предохраняют слизистую оболочку кишечника от возможного внедрения патогенных микробов [Besselink M.G.H. 2009];
- выполняют важную роль в поддержании колонизационной резистентности организма;
- стимулируют деятельность иммунной системы хозяина, индуцируют синтез интерферона и противовоспалительных интерлейкинов, способствуют образованию специфических антител, воздействуют на специфический и неспецифический иммунитет, стимулируя синтез иммуноглобулина А совместно с γ -интерфероном, улучшают эпителиальную резистентность и активируют клетки моноцитарно-макрофагального ряда; стимулируют дифференцировку Т-клеток в сторону супрессорного и цитотоксического фенотипов, способны активировать экспрессию генов провоспалительных цитокинов [Boirivant M., 2007, Fedorak R.N., 2008, Medzhitov R., 2007];
- участвуют в пищеварительной, биосинтетической, детоксицирующей и других функциях нормофлоры человека;
- играют значительную роль в метаболизме белков, жиров, углеводов, нуклеиновых кислот, желчных кислот, холестерина, гормонов, оксалатов;
- способны деградировать отдельные токсины, канцерогены, аллергены, препятствовать всасыванию токсичных продуктов метаболизма, в первую очередь аммиака и отдельных аминов;

Механизм влияния некоторых свойств *Lactobacillus*, положительно влияющих на организм человека, представлен в таблице 1.

Таблица 1 - Механизм влияния некоторых свойств *Lactobacillus*

Свойства <i>Lactobacillus</i>	Влияние на работу систем организма
продуцирование органических кислот – молочной и уксусной	снижение pH среды и в результате предотвращение развития других микроорганизмов [Boekhorst J., Helmer Q., Kleerebezem M. et al., 2006]
продуцирование перекиси водорода	ингибирующее действие перекиси водорода на рост грамположительных и грамотрицательных бактерий за счет сильного окислительного действия на молекулярные структуры их белков [Тюрин М.В. и др., 1989], вирусоцидное действие ацидофильных <i>Lactobacillus</i> в отношении вируса иммунодефицита человека (HIV типа I) [Доронин А.Ф., Шендеров Б.А., 2002]
продуцирование витаминов, дефензинов, гормонов, нейропептидов и др.	улучшение метаболизма
продуцирование летучих жирных кислот	участие в обеспечении энергией эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта [Соловьева И.В. и др., 2014]

Продолжение таблицы 1

расщепление холестерина в липидах сыворотки, блокировка фермента гидроксиметил-глутарат-СоА-редуктазы, ограничивающего скорость синтеза холестерина	снижение холестеринемии [Новокшенов А.А., Соколова Н.В., 2012].
выработка ферментов: В-галактозидазы, гликолазы и лактатдегидрогеназы (ЛДГ).	активное участие данных ферментов в метаболизме лактозы, что имеет большое клиническое значение у пациентов с лактазной недостаточностью [Новокшенов А.А., Соколова Н.В., 2012].
продуцирование антимикробных субстанций белковой природы - бактериоцинов (педиоцин А, ацидоцин В, диацетин В1, курвацин FS47, лактицин 3147, плантарицин С, энтерококцин, саливарицин, низин, саркацин 674, мутацин. и др.).	антимикробное действие бактериоцинов, в том числе ингибирование роста <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>

	[Соловьева И.В. и др., 2014]
активная конкуренция с потенциальными патогенами за лимитируемые питательные субстраты и места адгезии на эпителии путем блокирования рецепторов клеток слизистых оболочек макроорганизма	поддержание колонизационной резистентности организма
присутствие в клеточной стенке <i>Lactobacillus</i> пептидогликанов и тейхоевых кислот, которые являются поликлональными индукторами и иммуномодуляторами	активирование клеточного иммунитета и подавление продукции иммуноглобулина (Ig) E [Новокшенов А.А., Соколова Н.В., 2012]
продуцирование гликопептидов, ферментов, бактериоцинов	ингибирование образования канцерогенов и инактивирование фекальных бактериальных энзимов, конвертирующих проканцерогены, β -гиалуронидазы, азоредуктазы, нитро-редуктазы, β -глюкозидазы, β -глюкуронидазы [Онищенко Г.Г. и др., 2002].

Продолжение таблицы 1

участие в биотрансформации желчных кислот и стероидных гормонов	снижение уровня растворимых желчных кислот в фекалиях, что приводит к снижению риска развития рака прямой кишки [Онищенко Г.Г. и др., 2002].
способность к комменсализму	стимулирование размножения и кислотообразования <i>Bifidobacterium</i> [Эрвольдер Т.М. и др., 1986]

1.2. *Bifidobacterium*

Bifidobacterium (от лат. *bifidus* — разделённый надвое) — грамположительные, неподвижные, облигатные, неспорообразующие, не образующие в процессе жизнедеятельности газы, анаэробные (однако,

некоторые виды могут быть аэротолерантными), сахаролитические микроорганизмы [Biavati et al., 2000; Leahy et. al., 2005]. Все они хемоорганотрофы, активно сбраживают углеводороды с образованием преимущественно уксусной и молочной кислот в молярном соотношении 3:2, CO₂ не образуют. Некоторые виды могут расти в атмосфере, обогащенной до 10% CO₂. Их рост прекращается при pH ниже 4.5 или выше 8.5. [Харченко Н.В., 2016].

Bifidobacterium представляют собой полиморфные палочки - прямые, изогнутые, разветвленные, раздвоенные Y- или V-формы, булавовидные, лопатовидные. Клетки располагаются одиночно, парами, иногда цепочками, палисадом или розетками, размер клеток 0,5-1,3 х 1,5-8 мкм. Микроскопическая картина каждого вида *Bifidobacterium* имеет особенности по размеру, форме и расположению клеток.

Бактерии рода *Bifidobacterium* относятся к Империи *Caryotes*, Надцарству *Procaryotes*, Царству *Bacteria*, Отделу *Firmicutes*, Классу *Actinobacteria*, Подклассу *Actinobacteria*, Порядку *Bifidobacteriales*, Семейству *Bifidobacteriaceae*, Роду *Bifidobacterium*.

Согласно современной систематике известно 29 видов *Bifidobacterium* [Артюхова С.И., Зверева О.А., 2014]. Большинство из описанных к настоящему времени видов *Bifidobacterium* было выделено из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) млекопитающих, насекомых и птиц. Некоторые виды *Bifidobacterium*, как, например, *Bifidobacterium bifidum*, *B. breve* и *B. longum subsp. longum* относят к видам истинно «человеческого» происхождения. Другие – *B. gallinarum*, *B. angulatum* и *B. cuniculi* – описаны как виды «животного» происхождения [Felis G.E., Dellaglio F., 2007]. Некоторые виды чрезвычайно близки между собой, как, например, *B. pullorum* и *B. gallinarum*, другие были реклассифицированы до подвидов, как, например *B. longum subsp. infantis* [German J.B. et. al., 2008] или *B. animalis subsp. Lactis* [Ventura M., Zink R., 2002].

Исследования, проведенные в последнее десятилетие, благодаря

открытию высокочувствительных методов, существенно расширили знания в области видового разнообразия *Bifidobacterium* [Satokari R.M. et al., 2003, Чаплин А.В. и др., 2015, Шкопоров А.И. и др., 2007]. Открыто уже 43 вида *Bifidobacterium* [Okamoto M. et al., 2008], но состав видов, являющихся доминантными в ЖКТ человека, по данным ряда авторов [Favier C.F. et al., 2002., Matsuki T. et al., 2004, Бондаренко В.М., 2007] не меняется.

Bifidobacterium распределены по следующим основным экологическим нишам: кишечник человека, полость рта, вагинальная полость, желудочно-кишечный тракт животных (Бондаренко, 2007), кишечник насекомых, кисломолочные продукты и сточные воды. Однако две последние экониши – это вторичные места обитания *Bifidobacterium* (Домотенко и др., 2014).

Bifidobacterium являются основной пристеночной и просветной микрофлорой толстой кишки. В кишечнике человека *Bifidobacterium* содержится 10^8 - 10^{12} КОЕ в 1 мл кишечного содержимого, что составляет 80-90% всех анаэробов, обитающих в кишечнике. У детей до 2 лет *Bifidobacterium* являются численно преобладающими в микрофлоре толстой кишки по сравнению с другими микроорганизмами [Turroni F. et al., 2012]; максимум относительной численности *Bifidobacterium* наблюдается в 3 мес [Jakobsson H.E. et al., 2014]. Показано, что у детей, находящихся на искусственном вскармливании, количество *Bifidobacterium* в микрофлоре кишечника значительно снижено по сравнению с детьми на грудном вскармливании [Fan W. et al., 2013]. С возрастом количественный и качественный состав микрофлоры кишечника претерпевает значительные изменения: в частности, доля *Bifidobacterium* снижается до 1–5% [Ringel-Kulka T. et al., 2013].

Среди представителей рода *Bifidobacterium* колонизировать слизистую оболочку кишечника человека способны виды *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum* и *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. Также

иногда могут быть обнаружены *Bifidobacterium gallicum* и *Bifidobacterium kashiwanohense* [Mayo B., van Sinderen D., 2010]. Видовой состав *Bifidobacterium* в кишечной микрофлоре обладает значительной внутривидовой изменчивостью, а также меняется в зависимости от возраста. Наиболее представлен в численном плане в микрофлоре детей и взрослых вид *B. longum* [Чаплин А.В. и др., 2015].

В живом организме *Bifidobacterium* выполняют ряд важных функций:

- препятствуют проникновению токсинов и микробов внутрь, образуя кишечный барьер;
- вырабатывают органические жирные кислоты, являются антагонистами патогенной и условно патогенной флоры;
- принимают участие в пристеночном пищеварении и эвакуации пищевых субстратов из кишечника;
- способствуют нормальному пищеварению, всасыванию в кишечнике ионов железа, кальция, витаминов группы В, D.

Многочисленными исследованиями установлены антагонистические свойства *Bifidobacterium* по отношению к стафилококкам, сальмонеллам, клебсиеллам, протее [Ганина В.И. и др., 1999, Калмыкова А.И. и др., 2007, Kebary K.M.K., 1995], тифозным инфекциям [Silva F.V. et al., 1999], *Gardnerella vaginalis* [Саркисов С. Э. и др., 1999], а также холерным вибрионам [Кругликов В.Д., 2012]. Объясняется это следующим:

1) доминирующим заселением *Bifidobacterium* на стенках толстого кишечника, что лишает конкурирующие нежелательные микроорганизмы нутриентов и жизненного пространства и, как следствие, ведет к подавлению последних [Карпушина С.Г. и др., 1998, Шевелева С.А., 1999];

2) продуцированием бифидобактериями уксусной, молочной и муравьиной кислот, которые оказывают специфичную токсичность на основные штаммы грибов, дрожжей и бактерий, или путем снижения pH ингибируют рост гнилостных микроорганизмов [Шевелева С.А., 1999, Шульпекова Ю.О., 2003];

3) их способностью деконъюгировать желчные соли в свободные формы, обладающие большей биоцидальной активностью против «случайных» бактерий в кишечнике [Храмцов А.Г. и др., 1998];

4) активацией работы лимфатической системы и выработкой ею иммуноглобулинов [Хавкин А.И., 2006]. Имеются также сообщения [Biavati B. et al., 2006] о том, что *Bifidobacterium* могут предупреждать развитие некоторых вирусных инфекций.

Таким образом, *Bifidobacterium* препятствуют развитию условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, увеличивая резистентность организма хозяина к инфекционным заболеваниям.

Кроме того, *Bifidobacterium* разрушают и предотвращают накопление в кишечнике вредных продуктов обмена других микроорганизмов – индола, скатола, фенолов, а также биогенных аминов, обладающих канцерогенным действием. Детоксицирующую активность кишечных бактерий исследователи приравнивают к деятельности печени [Biavati B. et al., 2006, Харитонов В.Д. и др., 2000].

Bifidobacterium активно синтезируют в организме целый ряд витаминов [Шульпекова Ю.О., 2003], также обеспечивают нормальное всасывание витаминов группы В (обеспечивают устойчивость нервной системы к воздействию негативных факторов в виде частых стрессов и постоянного нервного напряжения), витамина К (участвует в процессах свертывания крови). Кроме витаминов эти микроорганизмы являются активными продуцентами некоторых незаменимых аминокислот, используя в синтезе в качестве источника азота аммиак [Borivant M., Strober W., 2007]. Ферментируя «сахара», *Bifidobacterium* создают в кишечнике кислую среду, которая улучшает всасывание в кровь кальция, железа, а также витамина Д [Шульпекова Ю.О., 2003].

Bifidobacterium способны вовлекать в метаболизм аммонийные ионы, что может повлиять на перемещение аммония из потока крови в толстую кишку. Это их свойство особенно важно для больных циррозом печени

[Tamime A.Y. et al., 1995, Clark P.A., Martin J.H., 1994].

1.3. Полимеразная цепная реакция

Одним из наиболее востребованных на сегодняшний день методов идентификации микроорганизмов является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР (Polymerase chain reaction (PCR))). Данный метод в 1983 году разработал американский биохимик Kary Mullis, за что в 1993 году был удостоен Нобелевской премии в области химии. Этому открытию сопутствовало развитие некоторых технологий. В частности, появление приборов, позволяющих автоматически синтезировать одноцепочечные фрагменты ДНК (олигонуклеотиды). В тот же период были обнаружены уникальные микроорганизмы, живущие в гейзерах, чья ферментативная система, в частности ДНК-полимераза, выдерживает высокие температуры горячих источников и сохраняет свою биологическую активность вплоть до 95°C, что является необходимым условием для проведения полимеразной цепной реакции. Открытие ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия. Оно позволило поднять медицинскую диагностику на качественно новый уровень. В дальнейшем метод был многократно усовершенствован и в настоящее время широко применяется в научных исследованиях, биологической и медицинской практике: в диагностике инфекционных и наследственных заболеваний, при выявлении мутаций, генотипировании, установлении отцовства, идентификации личности и др.

Суть метода ПЦР заключается в многократном копировании (амплификации) определенных участков генетического материала в исследуемом образце, в результате чего образуется то количество ДНК или РНК, которое достаточно для визуального анализа. При этом многократно копируется только заданный участок ДНК при условии, что он присутствует в исследуемом биоматериале. Возможность получения огромного количества

копий одного строго определённого участка генома значительно упрощает исследование имеющегося образца ДНК.

ПЦР состоит из трех основных процедур: подготовки исследуемой пробы материала, которая в большинстве случаев сводится к выделению ДНК или РНК; собственно полимеразной цепной реакции; детекции продукта ПЦР (амплифицированной нуклеиновой кислоты) (рис.1).

Проведение ПЦР начинается со стадии выделения ДНК из исследуемого материала. Благодаря этому происходит концентрирование выделенной ДНК инфекционного агента в минимальном объеме жидкости, используемой в ПЦР. В случаях, когда не требуется достижения высокой чувствительности анализа, достаточна их обработка, позволяющая лишь разрушить микробную стенку: нагревание в лизирующем буфере, ультразвуковая обработка или использование ферментов (лизоцим) без последующего выделения ДНК.

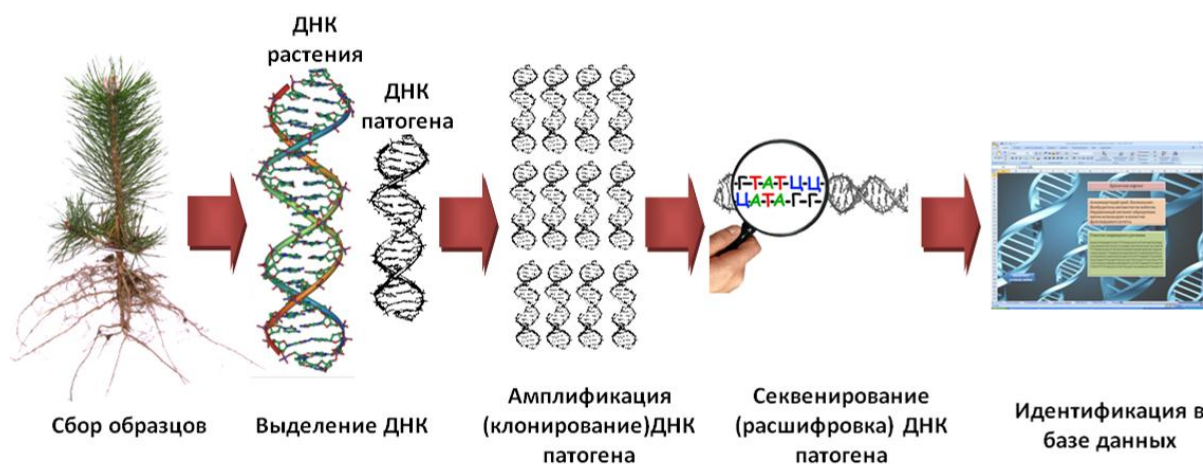


Рисунок 1 - Основные процедуры ПЦР

В настоящее время известны несколько способов подготовки пробы-образца для ПЦР-анализа. Процедура пробо-подготовки включает лизис клеточной стенки и содержимого микроорганизма и экстракцию нуклеиновой кислоты. С целью лизиса клетки используют кипячение при 94°C, замораживание-оттаивание в присутствии фермента лизоцима, а также

специальные лизирующие буферы, содержащие детергенты и протеиназу. Выбор метода зависит от природы микроорганизма, а точнее - природы его клеточной стенки.

Для выделения ДНК в основном используют два основных метода. Во-первых, применяют метод фенольно-хлороформной экстракции. При этом достигается хорошая очистка ДНК от ингибиторов Taq-полимеразы, однако неизбежны большие потери нуклеиновой кислоты, особенно при работе с образцами небольшого объема и низкой концентрацией инфекционного агента. Второй способ, применяемый для выделения нуклеиновой кислоты, основан на использовании сорбентов. Подготовка материала занимает меньше времени и более проста в исполнении, хотя не всегда может быть применена, так как данный метод не гарантирует удаление возможных ингибиторов.

Для проведения ПЦР требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- Два праймера, комплементарные концам требуемого фрагмента.
- ДНК-полимераза – термостабильный фермент, катализирующий реакцию полимеризации ДНК.
- Дезоксинуклеотидтрифосфаты (строительный материал для ДНК - АТФ, ГТФ, ТТФ, ЦТФ).
- Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции - pH, ионную силу раствора. Содержит соли, сывороточный альбумин.

Процедура ПЦР выполняется в 20 — 35 циклов (рис.2).

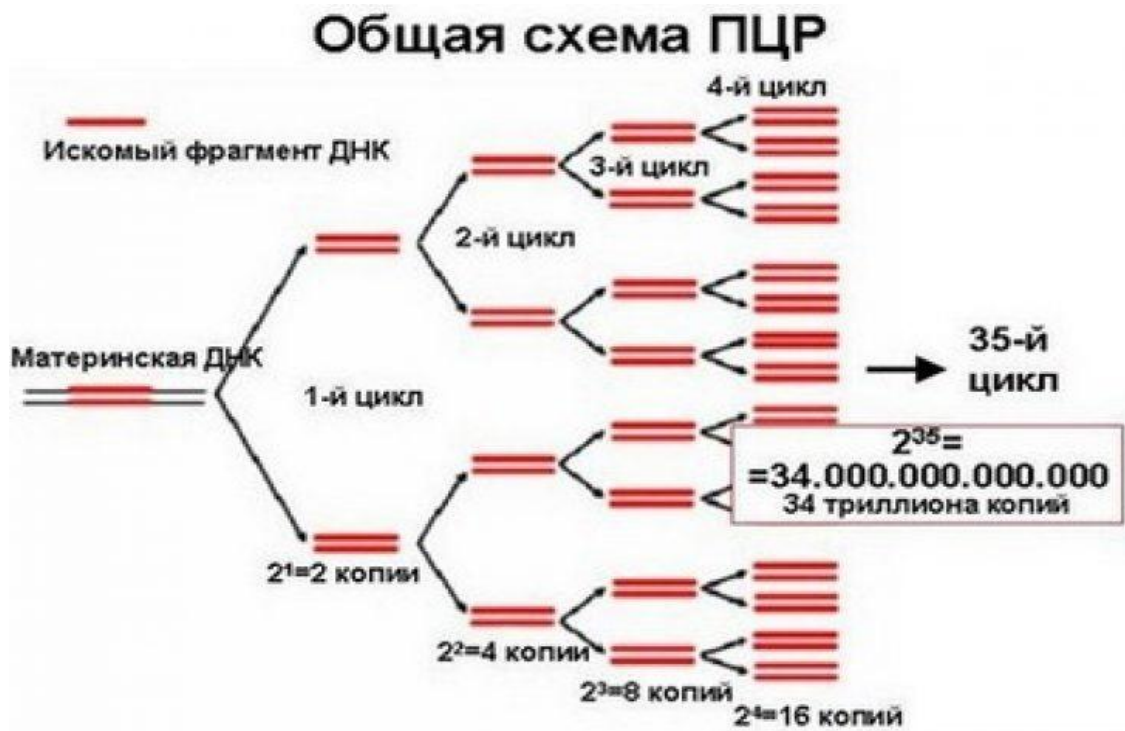
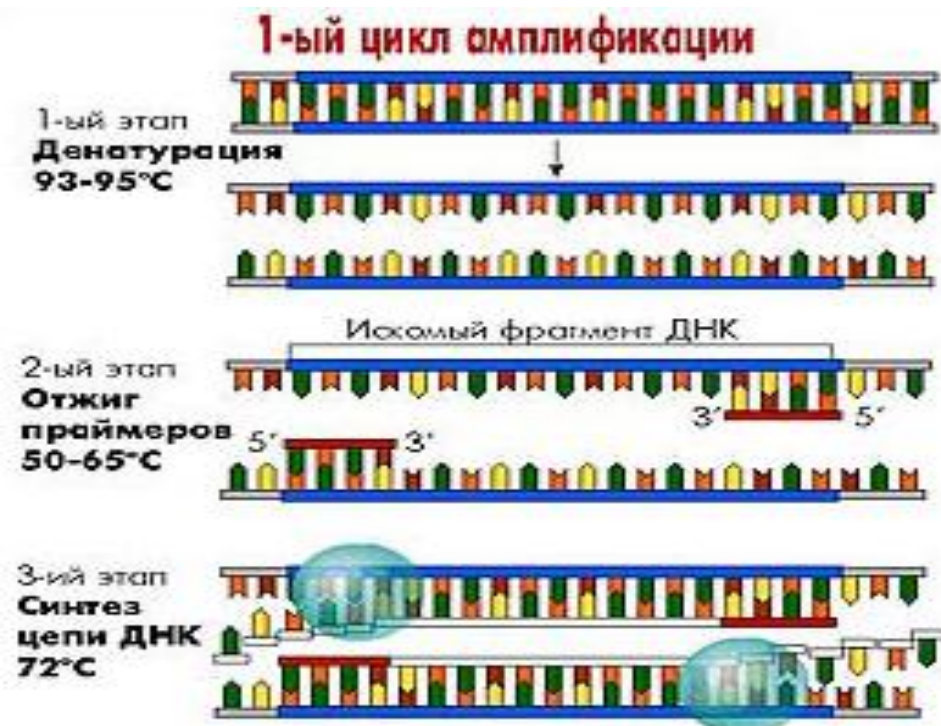


Рисунок 2 - Общая схема ПЦР

Каждый из циклов ПЦР состоит из трех этапов (рис.3): расплетение спирали ДНК, присоединение праймеров и образование новой цепи ДНК.



На первом этапе производится денатурация - расплетение двойной цепи ДНК. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 93 — 95°C на 0,5 — 2 мин., при этом разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК.

На втором этапе, называемом отжигом, происходит присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени. Праймеры – это короткие (50-30 пар оснований) искусственно синтезированные олигонуклеотиды со свободной 3'-ОН группой. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы. Праймеры подбирают так, что они ограничивают (фланкируют) искомый фрагмент и комплементарны концам требуемого фрагмента на противоположных цепях ДНК-мишени. Температуру при отжиге снижают до 50-65°C в зависимости от нуклеотидной последовательности праймеров, чтобы отжиг происходил в строго комплементарных участках. Время стадии — 0,5 — 2 мин. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).

На третьем этапе, называемом элонгация, происходит синтез новой цепи ДНК. ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матричной ДНК, и движется вдоль собираемой цепочки в направлении от 3' к 5'. Температура элонгации зависит от полимеразы. Полимераза, используемая в ПЦР, должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому часто используют ферменты, выделенные из термофилов - *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза и другие - они наиболее активны при 72 °C. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины

амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7—10 мин.

На сегодняшний день существует несколько основных способов детекции результатов ПЦР:

- электрофоретический (в агарозном или полиакриламидном геле)
- гибридизационно – ферментный
- гибридизационно – флуоресцентный:
- регистрация продукта после окончания реакции амплификации – «анализ по конечной точке»;
- детекция продукта в режиме «реального времени».

Во многих случаях при ПЦР-диагностике достаточно качественное детекции, т.е. получить ответ «да» или «нет», как, например, при первичном выявлении инфекционного патогена, судебно-медицинских исследованиях, определении генных мутаций, специфических онкоген. Обычным способом разделения получившихся продуктов ПЦР и идентификации определенного специфического гена является электрофорез в агарозном или полиакриламидном геле. Методики электрофоретического разделения продуктов ПЦР стандартизированы и дают воспроизводимые результаты. Результат должен быть обязательно отрицательным в контроле без добавления ДНК и положительным - в пробе с ДНК, содержащей обнаруживаемый участок гена. Положительный контроль представляет собой целевую ДНК или участок гена, который был клонирован в плазмиде или амплифицирован с помощью ПЦР.

Для учета результатов качественной ПЦР также может быть использован метод флуоресцентной детекции. Для этого по окончании ПЦР необходимо определить наличие или отсутствие определенного специфического сигнала с помощью специально-разработанных флуориметров (так называемый flash-метод). Поскольку при этом нет

необходимости в электрофоретическом оборудовании, то очевидна существенная экономия реагентов для лаборатории и рабочих зон.

Методы учета продуктов и результатов ПЦР без применения электрофореза наиболее уместны и выгодны для многопрофильных лабораторий, где ПЦР-методы составляют лишь часть общего производственного процесса.

В подобных крупных лабораториях наиболее часто определяется ограниченный круг наиболее востребованных микроорганизмов. В России предлагается целый ряд flash-наборов для диагностики возбудителей заболеваний, передающихся половым путем, и ряда вирусных инфекций. Такой набор патогенов вполне достаточен для лабораторий больниц, и они могут с начала своей деятельности сделать акцент на подобных методах анализа.

В некоторых клинических ситуациях возникает вопрос о динамике патологического процесса и/или эффективности проводимой антибактериальной терапии. Подобные вопросы наиболее актуальны при обследовании пациентов с такими хроническими инфекциями как гепатиты В и С, вирус иммунодефицита человека и др. При диагностике исходят из того, что накопление ампликонов ПЦР (продуктов) пропорционально содержанию копий необходимого гена в исследуемой пробе.

Анализ результатов количественной ПЦР можно проводить с помощью гель-электрофореза с учетом интенсивности специфических сигналов ПЦР. Правильная количественная оценка результатов ПЦР проводится только при наличии надежных положительных контрольных проб с известным содержанием копий искомого гена (например, 1000 копий гена гепатита С на одну ПЦР-реакцию). Ряд последовательных десятикратных разведений количественного контроля дает возможность построить калибровочные кривые, по которым можно оценивать содержание гена в клинических образцах.

ПЦР в реальном времени или количественная ПЦР (рис. 4) является

модификацией традиционной ПЦР. В количественной ПЦР амплификация продуктов происходит одновременно с определением количества амплифицированных продуктов. Для количественной ПЦР требуются праймеры, похожие на праймеры, используемые в традиционной ПЦР. Однако в отличие от традиционной ПЦР, для ПЦР в реальном времени используют либо олигонуклеотид, меченный флуоресцентным красителем, либо другие методы измерения флуоресценции, например, с пробой TaqMan или с красителем SYBR Green. В дополнение, требуется амплификатор, оснащенный флуоресцентным детектором. ПЦР в реальном времени следует ставить с положительным и отрицательным контролями и с контролями, которые помогут выявить наличие природных ингибиторов в тканях, крови и биологических жидкостях.



Рисунок 4

- ПЦР в реальном времени

Разработка флуоресцентных ДНК-зондов, которые добавляются в реакционную смесь наряду с «обычными» праймерами и дают возможность отслеживания хода ПЦР во времени, стала ключевым достижением в

проведении количественной ПЦР. Она в 1993-1994 гг. была внедрена в соответствующих диагностических системах и приборах по принципу TaqMan. Существуют также другие методы конструирования ДНК-зондов для количественной ПЦР.

Метод TaqMan предусматривает использование флуоресцентных ДНК-зондов, специфичных к средней части ампликона, участок между праймерами, и имеющих две метки на концах. Первая - флуоресцентная молекула, другая - молекула-гаситель этой флуоресценции. В ходе ПЦР Taq-полимераза достраивает нуклеотидную цепочку, а также разрушает связанный флуоресцентный зонд. После этого флуоресцирующая молекула выходит в свободное состояние и освобождается от влияния гасителя. По этой причине по мере амплификации продуктов ПЦР интенсивность флуоресценции возрастает пропорционально числу ампликонов и, соответственно, числу копий исходной ДНК. Специальный прибор, являющийся гибридом термоблока-амплификатора и флуориметра, осуществляет регулярные замеры флуоресценции в каждой пробирке. Для каждого клинического образца после 20-40 циклов ПЦР в результате получают индивидуальные кривые амплификации. По калибровочным кривым контрольного образца возможно вычислить, сколько копий искомого гена содержится в изучаемом образце.

Важной особенностью проведения ПЦР флуоресцентным методом является возможность не открывать пробирки с ПЦР-смесью при учете результатов. Благодаря этому уменьшается вероятность загрязнения помещений ампликонами и отпадает необходимость в выделении специальных рабочих зон для проведения электрофореза.

К основным преимуществам метода полимеразной цепной реакции можно отнести:

- Возможность выявления того или иного возбудителя напрямую. Подавляющее большинство классических методов лабораторной диагностики позволяют определить вирусы и микробы исключительно по присущим им косвенным признакам. Так, например, ИФА-диагностика позволяет

обнаружить в крови заболевших белки, образованные в ходе распада возбудителей болезней. Метод же ПЦР дает возможность увидеть специфический участок ДНК возбудителя.

- Высокую специфичность. В ходе изучения образцов, забранных у пациента, выделяется присущий только тому или иному возбудителю уникальный фрагмент ДНК.

- Высокую чувствительность. Выявление болезнетворных микроорганизмов возможно даже тогда, когда в человеческом организме присутствует всего один представитель своего вида.

- Универсальность. На сегодняшний день реакция ПЦР может быть получена практически при любом биологическом материале – от мочи и до соскоба клеток эпителия.

- Быстроту получения результата. Благодаря универсальности способа обработки предоставленного для анализа материала, распознаванию продуктов реакции, а также использованию современного оборудования произвести диагностику ПЦР ДНК можно всего за 5-6 часов.

- Возможность определения самых разнообразных возбудителей. Метод ПЦР-диагностики настолько чувствителен, что дает возможность определить возбудителя не только у больного, страдающего заболеванием в острой стадии, но и при хронической форме заболевания.

К основным недостаткам метода полимеразной цепной реакции относятся:

- Необходимость грамотного подхода к подбору последовательности праймеров. Конечно же, в лабораториях используются программы, существенно упрощающие поиск требуемых регионов ДНК, однако ни одна из имеющихся методик не гарантирует хорошую работу праймеров, ведь фактически они являются набором молекул разнообразного состава и длины.

Это является причиной возникновения «минусовых» фракций, представляющих собой молекулы, последовательность которых укорочена на одно или несколько оснований, причем местоположение пропущенного

нуклеотида в данной ситуации может быть любым. Именно поэтому получить качественный результат можно только после того, как эти фракции будут очищены.

- Сложности со смешиванием 4-х видов нуклеотидов. Различная пропорция нуклеотидов может повлечь за собой значительное увеличение ошибок ДНК-полимеразы в ходе амплификации. Именно поэтому в ходе ПЦР-анализа на инфекции требуется следить за концентрацией ионов магния ввиду того, что уменьшение катионов оказывает влияние на специфичность и температуру гибридизации праймеров.

- Необходимость соблюдения определенных технологий, а также тщательного соблюдения всех этапов исследования в изолированных друг от друга лабораторных зонах, обусловленная риском амплификации незначительных объемов неспецифических ДНК, способных привести к постановке неверного диагноза. Кроме того, ПЦР-анализ на инфекции больше используется для получения ответов на поставленные вопросы по принципу «да-нет», а именно о том, присутствует ли в образце возбудитель того или иного заболевания.

А вот для определения того, какой микроорганизм из огромного количества существующих имеется в образце, этот анализ подходит замечательно. Обуславливается это тем, что метод ПЦР наиболее эффективен тогда, когда тестовая реакция содержит одну или несколько пар праймеров. Если же в одной реакции задействовано большее количество пар праймеров, соответствующих разнообразным инфекциям, появляется проблема, связанная с возникновением артефактов.

- Возможность неправильной интерпретации результатов анализов, связанная с тем, что определение ДНК возбудителя далеко не во всех случаях свидетельствует о том, насколько он жизнеспособен, а также о непосредственной связи обнаруженного инфекционного агента с тем или иным патологическим процессом.

- Возможность получения неверного результата в случае неправильного

забора биоматериала. Строго говоря, для того, чтобы произвести качественный ПЦР-анализ, необходимо правильно забрать образцы биоматериала у пациента и правильно их подготовить.

- Необходимость максимально полного удаления антикоагулянтов и остатков гемма во время извлечения нуклеиновых кислот с целью обеспечения максимальной эффективности амплификации.

- Склонность ДНК-полимераз, используемых в ПЦР, к ошибкам.

1.4. Масс-спектрометрия MALDI-TOF

Одним из последних достижений мировой науки является внедрение в медицинскую лабораторную практику метода масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрия – это метод идентификации молекул путем измерения отношения их массы к заряду (m/z) в ионизированном состоянии. Методика масс-спектрометрии стала известна научному сообществу в 1912 г., когда английский физик Джозеф Джон Томсон создал первый масс-спектрограф и получил масс-спектры молекул кислорода, азота, угарного газа, углекислого газа и фосгена. Однако исследование биологических макромолекул на масс-спектрометре стало возможным не так давно – с тех пор как в 1985г. японский химик Коити Танака изобрел метод ионизации макромолекул без разрушения их структуры и использовал свое открытие для масс-спектрометрии белков, за что в 2002г. был удостоен Нобелевской премии. В том же 1985г. немецкие учёные Франц Хилленкамп и Михаэль Карас разработали более чувствительный метод с использованием низкомолекулярного органического соединения в качестве матрикса, названный ими матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI), который в настоящее время является одним из основных методов ионизации биомacroмолекул. Масс-спектрометрия наиболее эффективна при анализе нуклеиновых кислот (ДНК/РНК), белков и пептидов бактерий.

Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов может быть осуществлена двумя способами: по спектру белков микробов – белковое профилирование (MALDI-TOF MS) и по клеточным липидам – метод газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) и жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ЖХ/МС).

Возможность применения масс-спектрометрии в идентификации микроорганизмов основана на том, что состав белков, как и липидов бактериальной клетки, детерминирован генетически. Идентификация по белкам осуществляется в основном по рибосомальным белкам, которые присутствуют во всех микроорганизмах. Принцип идентификации заключается в сопоставлении белковых паттернов исследуемого микроорганизма с масс-спектрами базы данных и определении на основании этого его таксономической принадлежности [Sauer S. et al., 2008].

MALDI-TOF масс-спектрометр состоит из трех функциональных частей (рис.5):

- 1) лазер, под воздействием которого происходит десорбция/ионизация;
- 2) анализатор масс, который делит ионы согласно их соотношению масса/заряд (m/z) по времени пролета в вакууме;
- 3) детектор — устройство для определения разделенных ионов.

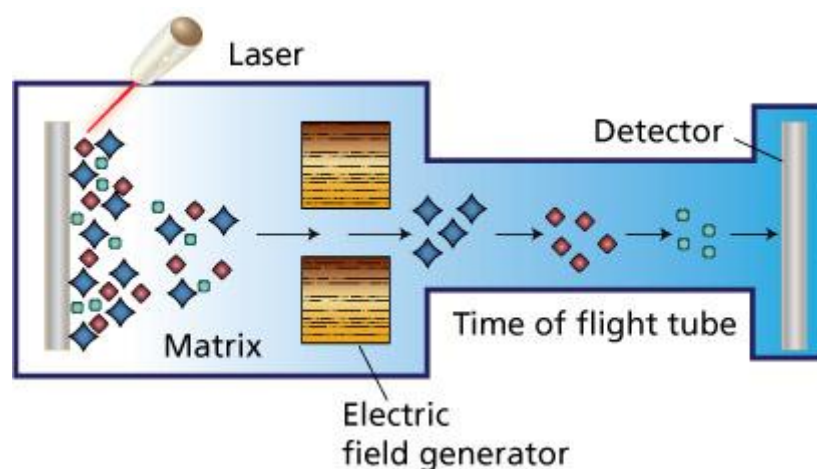


Рисунок 5 - Времяпролетный масс-спектрометр

Времяпролетный масс-спектрометр называется TOF, что переводится с английского языка как Time of flight. Название технологии говорит о том, что разделение заряженных частиц происходит на основе разного времени их пролета определенного расстояния. Масса молекулы оценивается по времени пролета от источника ионизации до детектора (рис.6).

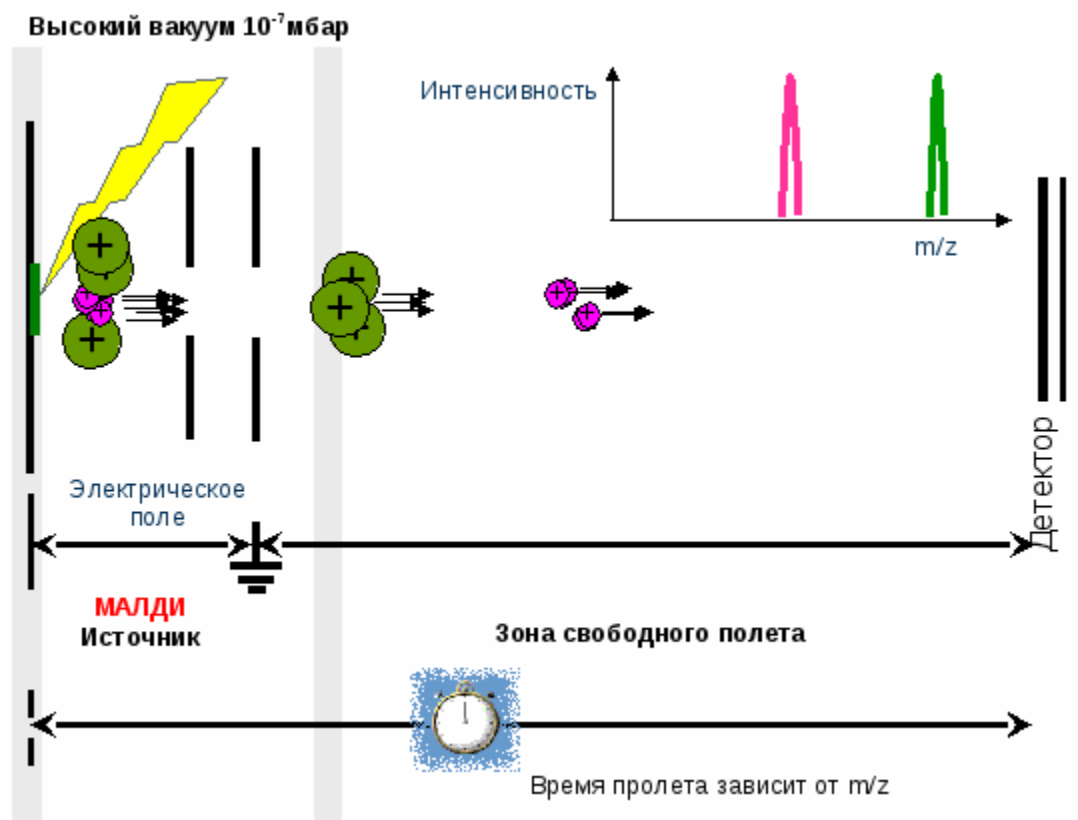


Рисунок 6 - Схема работы времяпролетного масс-спектрометра

Для проведения анализа первоначально исследуемые образцы культур микроорганизмов смешивают с матрицей. Состав матрицы может меняться в зависимости от анализируемых биомолекул и типа используемого лазера [Fenselau C., Demirev P.A., 2001]. Матрица выбирается таким образом, чтобы минимизировать разрушающее воздействие лазера на вещество. С другой стороны, материал матрицы способствует повышению ионизации, что, в свою очередь, ведет к повышению точности результатов. Наиболее часто используемые матрицы при исследовании белков — это α -циано-4-

гидроксикоричная кислота. Затем путем воздействия импульсами лазерного облучения на смесь матрицы с анализируемым веществом осуществляется «мягкая» ионизация белков микроорганизмов. Ионизированные молекулы белка ускоряются в электрическом поле, а затем поступают в полетную трубу, где разделяются по их индивидуальному соотношению масса/заряд. Ионы с меньшей массой пролетают расстояние до детектора быстрее, чем более крупные. Время пролета зависит от массы (m) и заряда (z) биоаналитов и пропорционально квадратному корню m/z . После попадания ионов на детектор и оцифровки результата программа масс-анализатора оценивает время пролета частиц, строится масс-спектр – график, по оси абсцисс которого находится соотношение m/z , а по оси ординат – количество ионов, зарегистрированных детектором в конкретный момент времени. Полученный масс-спектр сопоставляется со спектрами из базы данных масс-анализатора, и на основании сведений о массах характеристических белков осуществляется идентификация микроорганизмов. Спектр каждого микроорганизма уникален и несет характеристики, аналогичные «отпечатку пальца» [Lavigne J.-P. et al., 2013].

Лаборант, осуществляющий идентификацию микроорганизмов помощью масс-спектрометра MALDI-TOF, производит следующие действия:

- на подложке масс-анализатора смешивает идентифицируемые микроорганизмы (взятые из чистой культуры, отдельной колонии, среды обогащения) и раствор матрицы. Для подготовки 24 культур необходимо 10 минут, для 96 культур – 33 минуты;
- подготовленную культуру помещает в масс-анализатор и подвергает воздействию лазерных импульсов (ионизация).

Далее процесс идентификации осуществляется с помощью масс-спектрометра автоматически, без вмешательства исследователя. Идентификация культуры одного микроорганизма завершается менее чем за 2 минуты. Для идентификации 24 культур требуется 12 минут, для 96 культур – 43 минуты.

На сегодняшний день для идентификации микроорганизмов существуют 3 коммерческих MALDI-TOF Ms платформы: Andromas («Andromas sAs», Париж, Франция), Vitek-Ms («bioMérieux», Франция), Biotyper («Bruker Daltonics», Германия), для каждой из которых создана собственная идентификационная база, состоящая из более 25000 спектров, разработан алгоритм идентификации и пробоподготовки [Clark A.e. et al., Carbonnelle e. et al., 2012]. Многочисленные работы демонстрируют эффективность метода MALDI-TOF Ms-идентификации для определения таксономической принадлежности микроорганизмов разных видов и групп [Clark A.e. et al., 2013, Croxatto A. et al., 2012].

Масс-спектрометрия получает все более широкое использование в медицине: разработка новых лекарственных средств, контроль их производства, генная инженерия и биохимия, протеомика. В клинических лабораториях метод находит применение для масс-спектрометрического выявления большинства стероидных гормонов (включая экзогенного происхождения) и определения уровня аминокислот и ацилкарнитинов [Кирилюк А.А., 2014]. Масс-спектрометрия позволяет идентифицировать белки, определять их структурные изменения вследствие различных взаимодействий при их воспроизводстве, определять пути метаболизма лекарственных средств и других соединений и идентифицировать метаболиты, разрабатывать новые лекарственные средства.

Без масс-спектрометрии невозможен контроль над незаконным распространением наркотических и психотропных средств, криминалистический и клинический анализ токсичных препаратов, анализ взрывчатых веществ.

Основные достоинства и преимущества MALDI-TOF MS:

- позволяет отказаться от длительной, трудоемкой и ненадежной фенотипической идентификации микроорганизмов;
- невысокие требования к квалификации персонала;
- не требуется специальных расходных материалов;

- быстрая и простая подготовка пробы – 5 мин/образец;
- высокая чувствительность – 104-105 клеток, что соответствует единичной колонии или центрифугату жидкой культуры;
- возможности для видовой идентификации любых культивируемых микроорганизмов: мицелиальных грибов, дрожжей, грам-положительных и грам-отрицательных бактерий;
- высокая скорость идентификации – 1 мин/образец, 1,5 часа при одновременном исследовании 96 проб на панели;
- высокая точность идентификации до вида, которая превышает 98%;
- уменьшение себестоимости каждого исследования в 12-96 раз по сравнению с фенотипическими, ручными и автоматизированными методами.

Благодаря названным качествам на данный момент MALDI-TOF MS вытесняет традиционные методы в исследовательских центрах и в крупных зарубежных клинических лабораториях. Например, более 100 европейских медицинских центров используют MALDI-TOF MS.

Относительный недостаток при идентификации микроорганизмов масс-спектрометрическим методом – необходимость предварительно выделить чистую культуру, что увеличивает продолжительность исследования. Однако технология масс-спектрометрического анализа непрерывно совершенствуется. В настоящий момент проводятся клинические испытания методологии с использованием системы MALDI Biotyper для идентификации микроорганизмов непосредственно в моче.

Лабораторная апробация метода проходит в межклинической бактериологической лаборатории ММА им. И.М. Сеченова и показала эффективность – 99,7 %. В 4,5 % получены расхождения с микробиологическими данными.

Аналогичным подобным образом метод MALDI BIOTYPER используется для прямого исследования и идентификации положительной гемо-культуры. Процедура подготовки пробы состоит из последовательных центрифугирований образца и занимает не более 20 мин. При тестировании 50

положительных гемокультур методом масс-спектрометрии идентифицировано до вида 76 % микроорганизмов [Припутневич Т.В., 2014].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Бактериальные штаммы

Для получения культур исследуемых микроорганизмов родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* были приготовлены инокуляты из лиофилизированных бактерий. Для этого были выбраны пробиотики, наиболее широко используемые для нормализации микрофлоры влагалища и кишечника, содержащие в своем составе типовые штаммы *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum* и *B. longum*.

Характеристика используемых в работе пробиотиков приведена в таблице 2.

Для приготовления суспензии содержимое флакона (лиофилизат) растворили кипяченой водой комнатной температуры из расчета 5 мл воды на 1 дозу препарата.

Таблица 2 - Пробиотики, использованные в работе

№ лиофилизата (культуры)	Пробиотик	Характеристика препарата	Фармако- терапевтиче- ская группа	Фармакологические свойства	Показания
I	Лактобактерин (Микроген)	Препарат представляет собой микробную массу живого, антагонистически активного штамма <i>Lactobacillus</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i> 8P-A3 или <i>Lactobacillus fermentum</i> 90T-C4, не менее 2×10^9 живых <i>Lactobacillus</i>), лиофилизированную в среде культивирования с добавлением защитной сахарозо-желатино-молочной среды высушивания.	Эубиотик	Лактобактерин обладает высокой антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных микробов, включая стафилококки, энтеропатогенные кишечные палочки, протеи, шигеллы, что определяет коррегирующее действие препарата при нарушениях бактериоценоза. Препарат улучшает обменные процессы, препятствует формированию затяжных форм кишечных заболеваний, повышает неспецифическую резистентность организма.	Лечение заболеваний желудочно-кишечного тракта и женской половой сферы, сопровождающихся нарушениями нормальной микрофлоры. Препарат применяют взрослым и детям, независимо от возраста.

Продолжение таблицы 2

II	Гинофлор Э	Активные вещества: <i>Lactobacillus</i> ацидофильные (лиофилизат) (не менее 100 миллионов жизнеспособных бактерий), эстриол; Вспомогательные вещества: лактозы моногидрат, целлюлоза микрокристаллическая, магния стеарат, натрия карбоксиметилкрахмал, натрия дигидрофосфат.	Эстроген + эубиотик	Обе активные субстанции, входящие в состав препарата Гинофлор Э, эстриол и бактерии <i>Lactobacillus acidophilus</i> , участвуют в физиологическом механизме поддержания нормального биоценоза влагалища.	Восстановление флоры <i>Lactobacillus acidophilus</i> после местного и/или системного лечения антибиотиками или другими химиотерапевтическими средствами. Эстрогензависимые атрофические вагиниты в постменопаузе, в том числе в сочетании с заместительной гормональной терапией (ЗГТ). Бактериальный вагиноз
----	------------	---	---------------------	---	--

Продолжение таблицы 2

III	Вагилак	Каждая капсула Вагилак содержит пробиотические штаммы бактерий <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1™ и <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14™ в суммарном количестве не менее 10 ⁹ КОЕ/г бактерий. Вспомогательные вещества: декстроза, крахмал, целлюлоза микрокристаллическая, магния стеарат.	БАД. Не является лекарственным средством.	Вагилак способствует увеличению числа <i>Lactobacillus</i> , нормализации микрофлоры у женщин. Бактерии <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1™ и <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14™ восстанавливают естественную кислую среду во влагалище (pH 3,8-4,5) и повышают устойчивость слизистой к воздействию патогенных микроорганизмов.	Рекомендуется в качестве биологически активной добавки к пище - источника пробиотических <i>Lactobacillus</i> . Может применяться в составе комплексной терапии различных дисбиозов, в том числе во время и после терапии антибиотиками; при предродовой подготовке беременных.
-----	---------	---	---	--	---

Продолжение таблицы 2

IV	Бифидум бактерин (Микроген)	Препарат представляет собой микробную массу живых антагонистически активных штаммов <i>Bifidobacterium</i> (<i>Bifidobacterium</i> <i>bifidum</i> 1 или <i>Bifidobacterium</i> <i>bifidum</i> 791), лиофилизированную в среде культивирования с добавлением защитной сахарозо- желатино-молочной среды высушивания.	Эубиотик	Терапевтический эффект Бифидумбактерина обусловлен содержанием в нем живых <i>Bifidobacterium</i> , которые обладают антагонистической активностью против широкого спектра патогенных и условно- патогенных микроорганизмов и тем самым нормализуют микрофлору кишечника, улучшают деятельность желудочно-кишечного тракта, препятствуют формированию затяжных форм кишечных заболеваний.	Лечение и профилактика дисбактериозов различной этиологии (при заболеваниях желудочно- кишечного тракта и женской половой сферы) у детей и взрослых.
----	-----------------------------------	---	----------	--	--

Продолжение таблицы 2

V	Бифиформ	Активные вещества: <i>Enterococcus faecium</i> (не менее 1×10^7 КОЕ) и <i>Bifidobacterium longum</i> (не менее 1×10^7 КОЕ) Вспомогательные вещества: декстроза безводная, закваска дрожжевая. рожкового дерева бобов камедь, магния стеарат, лактулоза.	Эубиотик	Штаммы <i>Enterococcus faecium</i> и <i>Bifidobacterium longum</i>, входящие в состав препарата, являются естественными симбиотическими бактериями, населяющими желудочно-кишечный тракт. Препарат оказывает нормализующее действие на количественный и качественный состав микрофлоры кишечника. Действие обусловлено как непосредственным прямым эффектом входящих в состав препарата компонентов (высокая антагонистическая активность в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов), так и опосредованным - стимуляция местного кишечного звена иммунитета (активация синтеза иммуноглобулина А, индукция синтеза эндогенного	- Диарея, вызванная острым и обострением хронического гастроэнтерита, ротавирусной инфекцией; антибиотик-ассоциированная диарея; диарея путешественника; - в комплексной терапии острых кишечных инфекций; - в комплексной терапии хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта, таких как колит, синдром раздраженного кишечника и других желудочно-
---	----------	---	----------	---	---

Продолжение таблицы 2

				интерферона). <i>Bifidobacterium longum</i> обладает высокой выживаемостью в кишечнике человека и высокой скоростью роста. Включение в препарат апатогенного энтерококка <i>Enterococcus faecium</i>, колонизирующего в норме тонкий кишечник, позволяет оказывать положительное воздействие на состояние и пищеварительные функции не только толстого, но и тонкого кишечника, особенно при наличии бродильной диспепсии и явлений метеоризма.	кишечных расстройств функционального генеза; - нормализация микрофлоры кишечника, лечение и профилактика дисбактериозов и поддержание иммунной системы у детей старше 2-х лет и взрослых; - непереносимость лактозы; - в составе комплексной стандартной эрадикационной терапии у пациентов с хеликобактерной инфекцией.
--	--	--	--	--	---

2.2. Питательные среды и культивирование

2.2.1. Посев *Lactobacillus*

Для выделения и культивирования *Lactobacillus* из полученных суспензий была использована элективная питательная среда ЛАКТОБАКАГАР, производство ФГУП Государственный научный центр прикладной микробиологии. Питательная среда отличается высокой чувствительностью при сильной ингибирующей активности в отношении посторонней микрофлоры. *Lactobacillus* формируют в чашке Петри белые, блестящие колонии с ровными краями. Рост представителей остальных видов микроорганизмов подавлен.

Способ приготовления: 72,15 г среды тщательно размешать в 1 л воды дистиллированной, довести до кипения и кипятить в течении 5 мин, периодически перемешивая, до полного расплавления агара, профильтровать через ватно-марлевый фильтр, стерилизовать автоклавированием при температуре (121 ± 1) °C в течении 15 мин, охладить при комнатной температуре до $(45-50)$ °C и разлить в стерильные чашки Петри слоем 4-5 мм. Перед посевом чашки со средой подсушить в течении 40 мин при температуре (37 ± 1) °C. pH $5,7 \pm 0,3$

Состав, г/л:

Панкреатический гидролизат рыбной муки	20,0
Экстракт пекарных дрожжей	5,0
Экстракт мясной	5,0
Глюкоза	20,0
Калий фосфорнокислый однозамещенный	2,0
Натрий уксуснокислый	5,0
Твин-80	1,0 мл
Аммоний лимоннокислый однозамещенный	2,0
Магний сернокислый	0,1

Марганец хлористый	0,05
Агар	13,0±2,0

Посев *Lactobacillus* на чашки Петри проводили методом Дригальского. Берут 3 чашки Петри с питательной средой. В одну из чашек на питательный агар пастеровской пипеткой или петлей наносят каплю исследуемого материала и растирают стерильным шпателем по всей поверхности агара. Затем шпатель переносят во 2-ю чашку и втирают оставшуюся на шпателе культуру в поверхность питательной среды. Далее шпатель переносят в 3-ю чашку и аналогичным образом производят посев, после чего чашки помещаются в термостат. Суть метода Дригальского заключается в том, что с каждым последующим посевом культур концентрация бактерий все меньше. В последующем, в извлеченных из термостата чашках в зависимости от содержания микробных клеток в исследуемом материале на одной из чашек вырастают отдельные колонии различных бактерий, отличающиеся между собой по форме, цвету, величине, консистенции, пригодные для выделения чистой культуры микроорганизма. Отдельную (изолированную) «подозрительную», интересующую исследователя колонию снимают и засевают на скошенный агар. Из остатка колонии готовят микропрепарат и изучают при окраске по Граму. У выросших на скошенном агаре бактерий (как правило, одного вида) определяют биохимические, тинкториальные, антигенные свойства и делают заключение о выделенной культуре бактерий.

2.2.2. Посев *Bifidobacterium*

Для выделения и культивирования *Bifidobacterium* была использована БИФИДУМ-СРЕДА, производство ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии.

Рост *Bifidobacterium* в пробирке возможно зафиксировать при наблюдении колоний типа «комет», «гвоздиков», «тяжей», «шариков»

различной степени четкости, расположенные по всему объему столбика среды и прозрачной зоной в верхней его части.

Escherichia coli образует диффузное помутнение столбика среды с газообразованием в виде пены на поверхности; *Pseudomonas aeruginosa* – диффузное помутнение верхней части столбика среды с последующем распространении мутности вниз по среде.

Способ приготовления: 50,0 г среды тщательно размешать в 1 л воды дистиллированной, кипятить в течение 1 мин, периодически перемешивая, до полного расплавления агара. Профильтровать через ватно-марлевый фильтр, разлить по 9,0 мл в пробирки и стерилизовать автоклавированием при температуре 112 °С в течении 30 мин. Стерильную среду можно хранить не более 7 суток при температуре (2-8) °С, перед использованием регенерировать путем нагревания ее в кипящей водяной бане в течение 15-20 мин. рН 6,7 - 7,3

Состав, г/л:

Панкреатический гидролизат казеина	30,0
Экстракт пекарных дрожжей	5,0
Глюкоза	7,5
Лактоза	2,5
Цистеин	0,5
Натрий хлористый	2,5
Магний сернокислый	0,5
Кислота аскорбиновая	0,5
Натрий уксуснокислый	0,3
Агар	0,9

Методика посева *Bifidobacterium* в жидкую питательную среду. В левую руку берут две пробирки. В одной находится питательная среда (плотное или жидкое), в другой – исследуемый материал. Пробирки зажимают большим и указательным пальцами. Для того, чтобы можно было наблюдать за содержанием пробирок, их держат сверху кисти руки.

Пробирки должны быть кое-что наклоненными, и нужно следить, чтобы при открытии их материал или посторонние микробы из окружающих предметов из одной не попали в другую. Пробки из пробирок вынимают, держа их 4 и 5 пальцами правой руки. Тремя другими пальцами правой руки, как карандаш, держат бактериологическую петлю или пипетку, которыми распределяют исследуемый материал.

Сначала стерилизуют петлю в верхней части пламени газовой горелки. Пробирки открывают и край их проносят через пламя горелки. Петлю опускают в пробирку, где есть исследуемый материал, и, осторожно касаясь стенки, охлаждают. В последующем петлю опускают в пробирку и набирают материал. Если он находится в жидком состоянии, для посева достаточно капли жидкости, которая задерживается в кильке бактериологической петли. Когда используют микробов, которые выросли на поверхности среды, осторожно плавным движением набирают небольшое количество их, следя, чтобы не повредить питательную среду. Петлю медленно вынимают из пробирки, не касаясь ее стенок, и переносят в другую пробирку со средой. Штриховыми движениями от одной стенки пробирки к другой, начиная с нижней части среды, проводят занял материалу по скошенной поверхности агара снизу кверху. Петлю вынимают из пробирки, пробки и края пробирок проносят через пламя и закрывают. Петлю прожаривают в пламени, чтобы уничтожить микроорганизмы.

При посеве материала на жидкую питательную среду петлю с материалом окунают в жидкость. Если он не снимается из петли, его осторожно растирают на стенке пробирки и омывают средой. Материал, который набирали пастеровской или градуированной пипеткой, выливают в питательную среду, а для равномерного распространения его пробирку осторожно, чтобы не замочить пробку, стряхивают или вращают, зажав в ладонях.

2.2.3. Создание анаэробных условий

В лабораторной практике часто придется работать с анаэробными микроорганизмами. Важной является защита материала, который содержит анаэробные возбудители от токсичного влияния атмосферного кислорода. Они более прихотливы к питательным средам, чем аэробы, чаще нуждаются в специальных ростовых добавках, требуют прекращения доступа кислорода при их культивировании, длительность роста их длиннее. Потому работа с ними более сложна, требует значительного внимания.

Эвакуационно заместительный метод заключается в использовании анаэроостатов. Они представляют собой герметические металлические или пластмассовые банки, из которых можно выкачать кислород и заменить его инертным газом (гелий, азот, аргон). Допускается использование трехкомпонентной газовой смеси, которая состоит из 80 % азота, 10 % диоксиду углерода и 10 % водорода. Порой допустимым считается использование природного газа. Для поглощения кислорода, который остается в анаэроостате, используют палладиевые катализаторы. С целью поглощения водяной пары используют хлорид кальция, силикагель и тому подобное, которые помещают на дно анаэроостата.

2.3. Определение фенотипических признаков

2.3.1. Окраска по Граму

Окраска по Граму относится к сложному способу окраски. При сложных способах окраски на мазок воздействуют двумя красителями, из которых один является основным, а другой – дополнительным. Кроме красящих веществ, при сложных способах окраски применяют различные обесцвечивающие вещества: спирт, кислоты и т.д. Особенностью окраски

по Граму является неодинаковое отношение различных микроорганизмов к красителям трифенилметановой группы: генциановому, метиловому или кристаллическому фиолетовому. Микроорганизмы, входящие в группу грамположительных (Грам+), например стафилококки, стрептококки, дают прочное соединение с указанными красителями и йодом. Окрашенные микроорганизмы не обесцвечиваются при воздействии на них спиртом, вследствие чего при дополнительной окраске фуксином Грам(+) микроорганизмы не изменяют первоначально принятый фиолетовый цвет. Грамотрицательные (Грам-) микроорганизмы (бактероиды, фузобактерии и др.) образуют с генциановым кристаллическим или метиленовым фиолетовым и йодом легко разрушающееся под действием спирта соединение, в результате чего они обесцвечиваются и затем окрашиваются фуксином, приобретая красный цвет. Отношение микроорганизмов к окрашиванию по Граму имеет большое диагностическое значение.

Методика окраски:

1. Фиксированный мазок окрашивают через фильтровальную бумагу основным красителем – раствором основного карболового кристаллического фиолетового. Прокрашивание длится 1-2 минуты.
2. Снимают бумагу, сливают избыток красителя и, не промывая препарата водой, наливают раствор Люголя на 1-2 минуты до почернения препарата.
3. Раствор Люголя сливают. Предметное стекло для обесцвечивания мазка погружают несколько раз в стаканчик со спиртом, процесс обесцвечивания считается завершенным, когда от мазка перестают отделяться окрашенные в фиолетовый цвет струйки жидкости.
4. Препарат тщательно промывают водопроводной водой.
5. Докрашивают спирто-водным раствором фуксина в течение 1-2 минут. Результаты окраски Грам(+) микроорганизмы окрашиваются основным красителем в темно-фиолетовый цвет, Грам(-), воспринимая дополнительную окраску, приобретают ярко-малиновый цвет.

2.3.1. Биохимические тесты

Для идентификации бактерий по их способности к ферментации углеводов используют питательные среды Гисса, отличающиеся присутствием в составе одного из углеводов (лактозы, глюкозы, сахарозы, мальтозы или многоатомного спирта маннита (маннитола)).

Способ приготовления: 15,0 г сухой питательной среды размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят в течение 2-3 мин до полного расплавления агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по 4 мл в стерильные пробирки, стерилизуют автоклавированием при температуре $(112 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин. Цвет готовой среды – розовый.

Идентификацию культур, выделенных из нативного материала, производят со скошенного питательного агара. Используют культуры, выращенные в течение 18-24 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Если выделенная культура микроорганизма находилась какое-либо время на хранении при температуре $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ или в холодильнике при температуре $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$, производят предварительный посев ее на питательный бульон. Посевы инкубируют в течение 3 ± 1 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, затем осуществляют посев культуры на скошенный питательный агар. Через 18-24 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ делают смыв культуры с поверхности скошенного питательного агара 5 мл стерильной дистиллированной воды в обоих рассмотренных случаях посевов.

Стерильной градуированной пипеткой вместимостью 1 мл 2-го класса точности вносят по 0,1 мл микробной суспензии в пробирки с питательными средами. Регистрацию результатов проводят через 18-20 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ визуально. Среда Гисса позволяет идентифицировать микроорганизмы, содержащие ферментирующие углеводы, по кислотообразованию (изменение цвета среды с розового на синий) и газообразованию (появлению пузырьков газа в глубине среды или

на ее поверхности).

Необходимо отметить, что первичное установление способности ферментировать сахара, многоатомные спирты, способность к гидролизу глюкозидов и видовая идентификация этих микроорганизмов были проведены в 1990 году при их выделении с использованием доступных и актуальных на тот момент тест-систем и питательных основ. Нашей задачей являлось расширенное изучение биохимических свойств этих штаммов с использованием коммерческих стандартизированных тест-систем.

Для идентификации и дифференциации микроорганизмов по биохимическим признакам используют наборы «Anaerotest 23» («Lachema», Чехия).

Набор АНАЭРОтест 23 предназначен для биохимической идентификации анаэробных бактерий, прежде всего из клинического материала и из пищевых продуктов. Набор состоит из 10 стриппированных пластмассовых пластинок размером 8,5 x 12,5 см, содержащих 96 ячеек (4 трехрядных стрипа по 24 ячейки) с высушенными питательными средами и субстратами для 23 тестов: индол, глюкоза, мальтоза, фруктоза, галактоза, лактоза, мелецитоза, уреазы, нитраты, сахароза, салицин, трегалоза, маннитол, рамноза, N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза, β -глюкозидаза, эскулин, манноза, раффиноза, целлобиоза, ксилоза, арабиноза и сорбитол.

Из чистой 48 часовой культуры приготовили суспензию в суспензионной среде для АНАЭРОтеста 23. Тщательно гомогенизировали суспензию. Мутность суспензии должна соответствовать 3 степени мутности по шкале McFarland. Более жидкая или более густая суспензия может привести к ложным реакциям. При гомогенизации ампулу держали в вертикальном положении и двигали петлей по ее внутренней поверхности, предупреждая попадание воздуха в суспензионную среду. Параллельно сделали посев суспензии культуры для проверки чистоты культуры, ее ростовых свойств (в аэробных и анаэробных условиях) и/или

для постановки дополнительных тестов.

Суспензию бактерий в суспензионной среде тщательно гомогенизировали при помощи микропипетки, предупреждая попадание воздуха в суспензионную среду. Инокулировали по 0,15 мл суспензии во все лунки в соответствующих трех рядах пластинки. После инокуляции добавили в лунки Н первого ряда (тест IND) по 2 капли парафинового масла.

После инокуляции закрыли пластинку предохранительной пленкой. Вложили пластинку в пакет из полиэтилена, открытый конец пакета загнули под пластинку, чтобы инокулят не высыхал при инкубации. Инкубировали инокулированную пластинку классическим методом в анаэробных условиях (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) в течение 48 часов при температуре 37°C. АНАЭРОтест 23 всегда нужно инкубировать с индикатором анаэробной атмосферы.

После 48 часовой инкубации проверили наличие роста на чашке Петри, инкубированной в аэробных условиях. Проверили чистоту культуры на контрольной чашке Петри, инкубированной в анаэробных условиях. Учили реакции на пластинке АНАЭРОтест 23: Добавили реактивы в следующие лунки: 1-ый ряд, лунка Н (тест IND) – 2 капли Реактива для теста индол, – 2-ой ряд, лунка Н (тест NIT) – 1 капля Реактива для теста нитраты. Результаты всех реакций АНАЭРОтест 23 занесены в бланки (таблица 3), а также показаны на рисунке 7.

Идентификация: по результатам окраски по Граму и микроскопии отнесли идентифицируемую анаэробную бактерию в одну из четырех групп: грамотрицательные палочки, грамположительные спорообразующие палочки, грамположительные неспорообразующие палочки, кокки. Идентификацию в соответствующей группе проводили с помощью «Идентификационной таблицы», а также пользовались Книгой кодов для набора АНАЭРОтест 23, или же при помощи компьютерных программ «Система микробиологического мониторинга «Микроб 2» со

встроенной «Идентификацией» и «Микроб-Автомат». После употребления микротест-системы обеззараживаются в дезинфицирующем растворе либо автоклавируются.

Таблица 3 - АНАЭРОтест 23. Интерпретация реакций

Колонка	Тест	Код	Реакция	
			положительная	отрицательная
Ряд 1				
Н	Индол	IND	красно-фиолетовая, красная, розовая	желтоватая
G	Глюкоза	GLU	желтая, желто-коричневая	фиолетовая, коричнево-фиолетовая
F	Мальтоза	MLT	желтая, желто-коричневая	фиолетовая, коричнево-фиолетовая
E	Фруктоза	FRU	желтая, желто-коричневая	фиолетовая, коричнево-фиолетовая
D	Галактоза	GAL	желтая, желто-коричневая	фиолетовая, коричнево-фиолетовая
C	Лактоза	LAC	желтая, желто-коричневая	фиолетовая, коричнево-фиолетовая
B	Мелеситоза	MLZ	желтая, желто-коричневая	фиолетовая, коричнево-фиолетовая
A	Уреаза	URE	красно-фиолетовая, красная	желтая, светло-оранжевая
Ряд 2				
Н	Нитраты	NIT	темно-красная, красная	бесцветная, розовая
G	Сахароза	SUC	желтая, желто-коричневая	фиолетовая, коричнево-фиолетовая

F	Салицин	SAL	желтая, желто- коричневая	фиолетовая, коричнево- фиолетовая
E	Трегалоза	TRE	желтая, желто- коричневая	фиолетовая, коричнево- фиолетовая
D	Маннитол	MAN	желтая, желто- коричневая	фиолетовая, коричнево- фиолетовая
C	Рамноза	RHA	желтая, желто- коричневая	фиолетовая, коричнево- фиолетовая
B	N-Ацетил- β -D- глюкозаминидаза	NAG	желтая	бесцветная
A	β -Глюкозидаза	bGL	желтая	бесцветная
Ряд 3				
H	Эскулин	ESL	черная, темно- коричневая, темно-серая	бесцветная, светло- коричневая, светло-серая
G	Манноза	MNS	желтая, желто- коричневая	фиолетовая, коричнево- фиолетовая
F	Раффиноза	RAF	желтая, желто- коричневая	фиолетовая, коричнево- фиолетовая
E	Целлобиоза	CEL	желтая, желто- коричневая	фиолетовая, коричнево- фиолетовая
D	Ксилоза	XYL	желтая, желто- коричневая	фиолетовая, коричнево- фиолетовая
C	Арабиноза	ARA	желтая, желто- коричневая	фиолетовая, коричнево- фиолетовая
B	Сорбитол	SOR	желтая, желто- коричневая	фиолетовая, коричнево- фиолетовая
A	Контроль роста	CON		

1		H	G	F	E	D	C	B	A
		IND	GLU	MIT	FRU	GAL	LAC	MLZ	URE
	⊕								
2		H	G	F	E	D	C	B	A
		NIT	SUC	SAL	TRE	MAN	RHA	NAG	bGL
	⊕								
3		H	G	F	E	D	C	B	A
		ESL	MNS	RAF	CEL	XYL	ARA	SOR	CON
	⊕								
4		H	G	F	E	D	C	B	A
		IND	GLU	MIT	FRU	GAL	LAC	MLZ	URE
	⊕								

Рисунок 7 - АНАЭРОТест 23. Интерпретация реакций

2.4. ПЦР-анализ

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 (pH 9,1, 100 mM), крезоловый красный, ddH₂O. Для этого растворить 0,5 г Chelex 100, 5 мл TRIS-HCl и 0,5 мл Triton X-100 в 50 мл в ddH₂O. Добавить щепотку красителя крезоловый красный и перемешать до полного растворения. Рекомендуется постоянно ресуспендировать готовый реактив для растворения частичек, осевших на дно. Хранить реактив при температуре +4°C.

Ход работы:

1. Подготовить и расставить в штативе необходимое количество одноразовых стерильных пробирок типа Eppendorf объемом 1,5 мл, промаркировать.

2. В каждую пробирку одним наконечником добавить по 200 мкл реактива. Рекомендуется использовать синие наконечники с отрезанным кончиком. Обязательно должен быть фильтр или вата. Если фильтр

окрасится, необходимо поменять наконечник.

3. Внести по 50 мкл суспензии образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром.

4. Тщательно ресуспендировать пробирки на вортексе и затем поместить в термостат с температурой 95°C на 10 минут. После окончания инкубации необходимо повторно перемешать содержимое пробирок на вортексе.

5. Центрифугировать пробирки при 12 тыс об/мин в течение 5 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Полученные пробы можно хранить в течение 1 месяца, при условии хранения образцов в холодильнике при 4°C.

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

В данной работе использовали родо- и видоспецифичные праймеры для идентификации *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*:

= <i>Lactobacillus</i> spp.	= <i>Bifidobacterium</i> spp.
– <i>L. acidophilus</i>	– <i>B. adolescentis</i>
– <i>L. brevis</i>	– <i>B. adolescentis</i> 2
– <i>L. brevis</i> 2	– <i>B. angulatum</i>
– <i>L. casei</i>	– <i>B. animalis</i>
– <i>L. delbrueckii</i>	– <i>B. bifidum</i>
– <i>L. fermentum</i>	– <i>B. bifidum</i> 2
– <i>L. plantarum</i>	– <i>B. breve</i>
– <i>L. rhamnosus</i>	– <i>B. longum</i>
– <i>L. rhamnosus</i> 2	– <i>B. longum</i> 2

Амплификацию участков ДНК проводили с использованием стандартных наборов реагентов «ПЦР-микс: 2,5-кратная реакционная

смесь для проведения ПЦР-РВ» (Синтол). Набор содержит все необходимые реактивы: дезоксинуклеозидтрифосфаты, ПЦР-буфер, $MgCl_2$, Taq ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами, де-ионизированную воду, кроме праймеров и зондов.

Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом в 25 мкл, содержащей 5 мкл исследуемого образца ДНК, 10 мкл 2.5× ПЦР-микс, по 1 мкл прямого и обратного праймера.

Реакцию амплификации проводили по программе со следующими параметрами. На начальном этапе проводилась денатурация ДНК при 95°C в течение 1 мин, после чего следовали 30 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации ДНК в течение 30 сек при 95°C, стадию отжига праймеров продолжительностью 40 сек при температуре 60°C и стадию элонгации в течение 20 сек при температуре 72°C, которая оптимальна для активности Taq-полимеразы (дополнительно считывание уровня флюоресценции). На заключительной стадии реакционная смесь выдерживалась при температуре 72°C в течение 2 мин для завершения построения комплементарных цепей фрагментов ДНК и исключения копий, содержащих не полностью достроенные молекулы.

Для ПЦР в режиме реального времени использовали амплификатор CFX96 Touch™ («BioRad», США). Учет результатов проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Результаты представлены в виде графиков амплификации.

1. Подготовить и расставить в штативе пробирки с тотальной ДНК, 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I, ddH_2O , растворы праймеров для разморозки; ресуспендировать на вортексе.

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

3. В подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки внести по 8 мкл ddH_2O , после чего внести по 10 мкл 2,5х-ной

реакционной смеси, используя наконечники без фильтра.

4. Добавить в каждую пробирку по 1 мкл растворов каждого праймера.

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

6. Пробирки плотно закрыть, перемешать содержимое встряхиванием, затем перенести пробирки в амплификатор и расставить соответствующим образом.

7. На приборе создать эксперимент с соответствующими параметрами плашки: размер, тип, режим сканирования, флуорофор, названия проб; указать объем реакционной смеси в одной пробирке. Затем запустить программу с параметрами согласно таблице 4.

8. По окончании амплификации по показателю индикаторного цикла отметить положительные и отрицательные результаты.

Таблица 4 - Режим амплификации

	Температура	Время	Количество циклов
Исходная денатурация	95 °C	1 мин	1
Денатурация	95 °C	30 сек	30
Отжиг	60 °C	40 сек	
Элонгация + чтение плашки	72 °C	20 сек	
Финальное удлинение	72 °C	2 мин	1

2.5. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ

Все исследуемые штаммы были изучены методом MALDI-TOF масс-спектрометрии на масс-спектрометре с помощью анализатора микроорганизмов BioMerieux VITEK MS MALDI TOF. Экстракция белков осуществлялась непосредственно на одноразовом слайде с использованием

готового матрикса для VITEK MS. Интерпретация результатов проводилась на базе данных VITEK MS, разработанной на платформе компании Anagnostec и состоящей из клинически значимых видов с использованием Расширенного Классификатора Спектров.

Технологии идентификации микроорганизмов происходит путем получения спектра рибосомальных белков с помощью MALDI-TOF (матричная лазерная время пролетная масс-спектрометрия) и анализа спектра с помощью базы данных Vitek MS. База данных состоит из клинически значимых видов и более 25000 спектров. Надежная валидация с использованием расширенного классификатора спектров. Для каждого вида в базе данных получены спектры большого количества штаммов достоверного определения (идентификации) микроорганизмов.

Метод позволяет избежать предварительной длительной пробоподготовки и определяет спектр белков напрямую из бактериальной колонии, взятой с чашки первичного посева материала.

Вся методика идентификации на Vitek MS (MALDI-TOF) состоит из двух этапов:

Этап 1: Подготовка образца. Анализ начинается с того, что на подложке масс-спектрометра смешивают биоматериал из колонии бактерий и специальную матрицу (2',5' дигидроксibenзойная кислота), раствор уже готов к использованию и устойчив к свету). Затраты по времени для подготовки 24 изолятов – 10 минут.

Этап 2: Идентификация. После образец 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. Затраты по времени на идентификацию 24 изолятов – 12 минут.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Идентификация видов *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* традиционными биохимическими методами

Для первичной идентификации полученные суспензии бактерий были окрашены по Граму (рис.8).

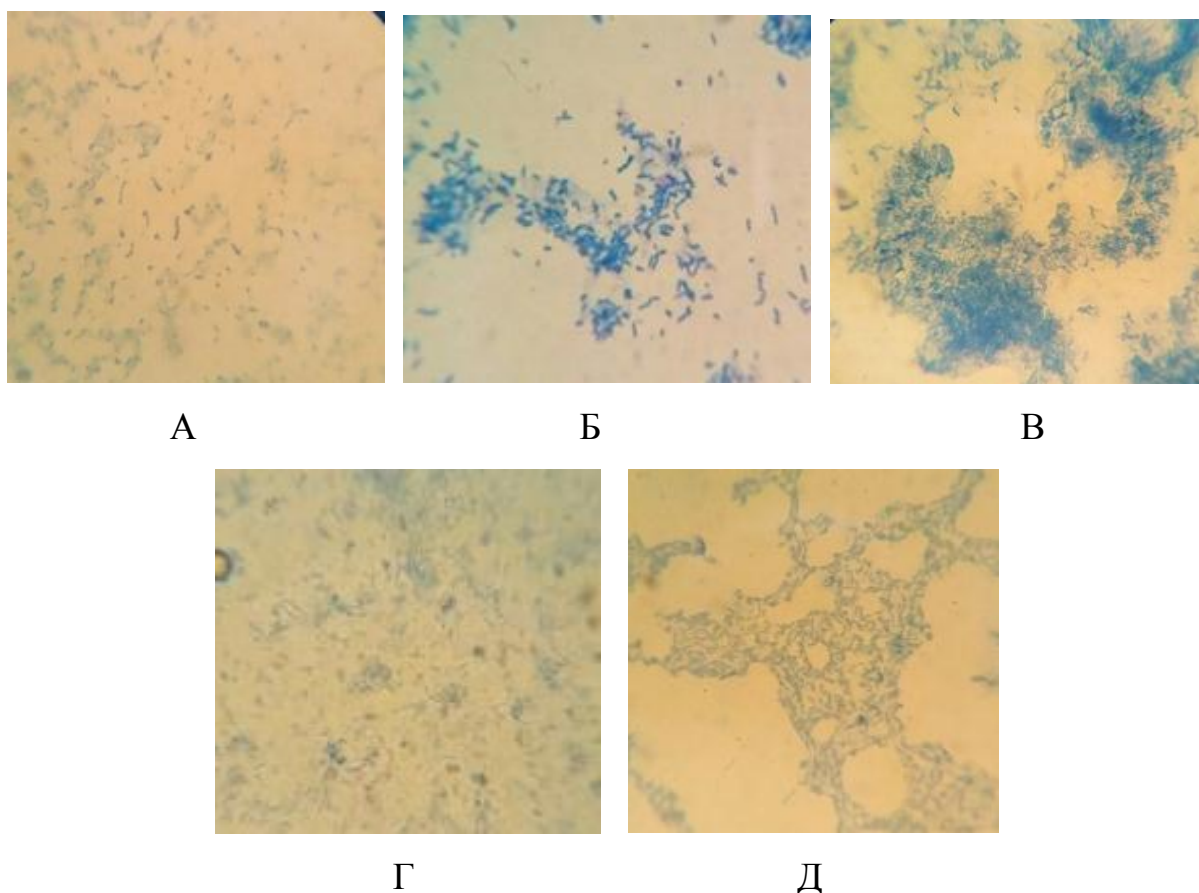


Рисунок 8 - Лиофилизаты из препаратов: А – Лактобактерин (I),
Б – ГинофлорЭ (II), В – Вагилак (III), Г – Бифидумбактерин (IV),
Д – Бифиформ (V). Окраска по Граму. $\times 1000$

При культивировании на питательной среде Лактобакагар при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в анаэробных условиях в эксикаторе со свечой при повышенном содержании CO_2 в течение 24-48 часов все *Lactobacillus* образуют однотипные колонии S-формы 1-2 мм, выпуклые, гладкие, белого цвета с

ровными краями, непрозрачные, пигмента не образуют, без блеска, легко снимаются петлей с поверхности плотной питательной среды. На данном этапе межвидовая дифференциация невозможна (рис.9).

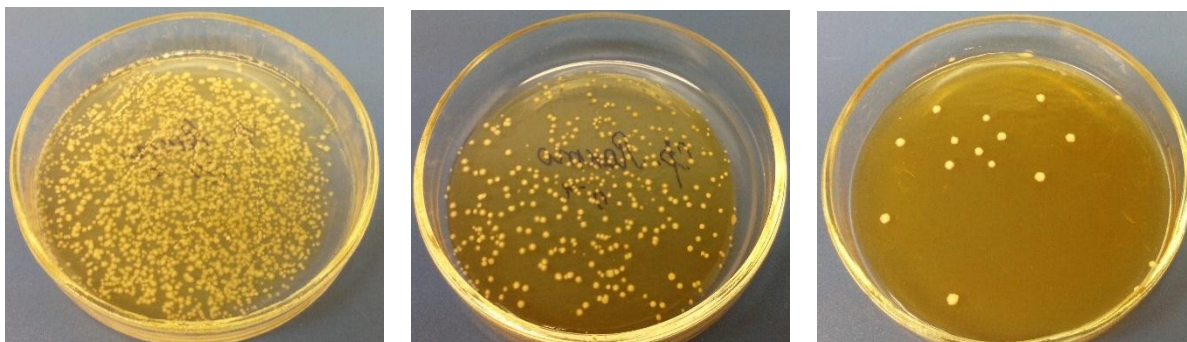


Рисунок 9 - Колонии *Lactobacillus* по методу Дригальского

При культивировании в полужидкой питательной среде Бифидум-среда при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в анаэробных условиях в эксикаторе со свечой при повышенном содержании CO_2 в течение 24-48 часов все *Bifidobacterium* образуют характерные образования в форме «кустиков» или «комочков». На данном этапе межвидовая дифференциация невозможна (рис.10).



Рисунок 10 - Рост *Bifidobacterium* в полужидкой питательной среде

Для дальнейшей идентификации микроорганизмов проводили окраску по Граму колоний, выросших на питательных средах (рис. 11).

Lactobacillus – грамположительные палочки различной длины с закругленными концами. В мазке расположены беспорядочными скоплениями и отдельными цепочками. Спор и капсул не образует.

Величина клеток 5-10 мкм.

Bifidobacterium – грамположительные палочки, располагаются поодиночке, в парах. Их размер составляет 1-8 мкм.

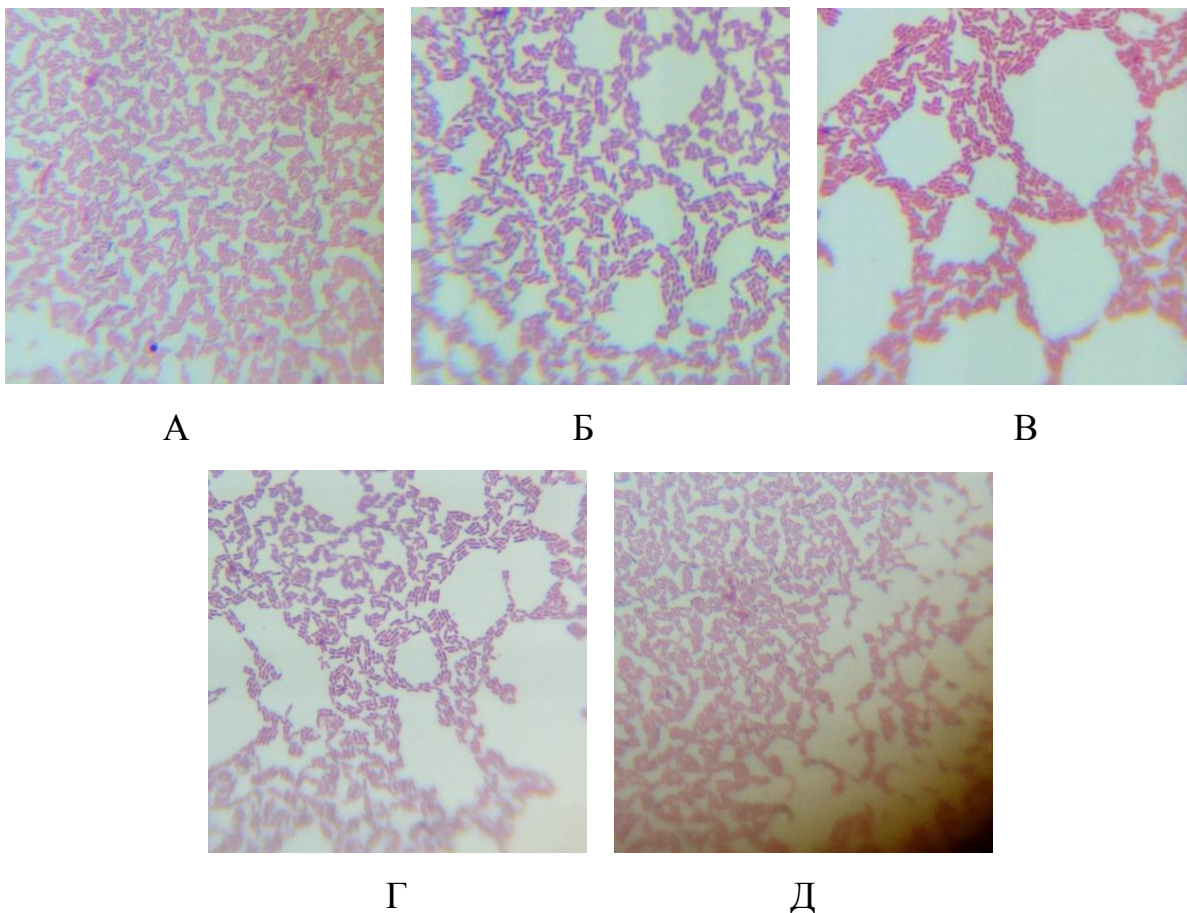


Рисунок 11 - Чистые культуры *Lactobacillus*- и *Bifidobacterium*:

А – культура I, Б – культура II, В – культура III,

Г – культура IV, Д – культура V. Окраска по Граму. $\times 1000$

Для быстрой и точной идентификации видов родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* в микробиологии используются различные методы. «Золотым стандартом» являются биохимические тесты, основанные на ферментативной активности бактерий. Для этого используются различные субстраты, метаболиты которых дают цветную окраску. С помощью широкого спектра субстратов можно идентифицировать вибрионы путем детекции активности бактериальных ферментов. Идентификация и дифференциация видов родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*

традиционными культуральными и биохимическими методами является трудоемким и процессом и занимает много времени. Так же недостатки традиционных методов заключаются в интерпретации результатов исследования. Это объясняется большим фенотипическим сходством этих видов, вариабельностью признаков и, как следствие – относительной диагностической ценностью отдельных таксономических тестов.

На первом этапе нашего исследования мы с целью оценки диагностической значимости биохимических методов в идентификации близкородственных видов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* провели определение видовой принадлежности выделенных из пробиотиков *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* с помощью общепринятых биохимических таксономических тестов. Для определения биохимических свойств выделенных штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* по их способности к ферментации сахаров, многоатомных спиртов и гидролизу глюкозидов были использованы наборы «ANAEROtest 23» («Lachema», Чехия).

Идентификацию и дифференциацию микроорганизмов до рода по биохимическим признакам проводили с помощью Идентификационной таблицы «Грамположительные анаэробные неспорообразующие палочки», включенной в набор. Пояснения: + = положительная реакция, – = отрицательная реакция, (+) = большей частью положительная реакция, (–) = большей частью отрицательная реакция, d = вариабильная реакция.

Таким образом, выделенная культура I на 73,91% соответствует роду *Lactobacillus* и на 91,30% роду *Bifidobacterium*. Выделенная культура II – 82,61% род *Lactobacillus* и 91,30% род *Bifidobacterium*. Выделенная культура III – 73,91% род *Lactobacillus* и 65,22% род *Bifidobacterium*. Выделенная культура IV – 78,26% род *Lactobacillus* и 82,61% род *Bifidobacterium*. Выделенная культура V – 69,57% род *Lactobacillus* и 91,30% род *Bifidobacterium*.

Интерпретация результатов представлена в таблицах 5 и 6.

Таблица 5 - АНАЭРОтест 23. Результаты

Тест	Код	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	культура I	культура II	культура III	культура IV	культура V	<i>Bifidobacterium</i> <i>spp.</i>
Индол	IND	—	—	—	—	—	—	—
Глюкоза	GLU	+	+	+	+	+	+	+
Мальтоза	MLT	d	+	+	+	—	+	+
Фруктоза	FRU	+	+	+	+	+	+	+
Галактоза	GAL	+	+	+	+	+	+	+
Лактоза	LAC	d	+	+	+	+	+	+
Мелецитоза	MLZ	—	+	+	+	—	+	+
Уреаза	URE	—	—	—	—	—	—	—
Нитраты	NIT	—	—	—	—	—	—	—
Сахароза	SUC	+	+	+	+	—	+	+
Салицин	SAL	+	+	+	+	—	+	—
Трегалоза	TRE	—	+	+	+	—	+	(—)
Маннитол	MAN	—	+	—	+	—	—	—
Рамноза	RHA	—	—	—	+	—	—	—
Н-Ацетил-β-D- глюкозаминидаза	NAG	(—)	+	+	+	+	+	d
β-Глюкозидаза	bGL	+	+	+	+	+	+	+
Эскулин	ESL	+	+	+	+	—	—	d
Манноза	MNS	d	+	+	+	—	+	d
Раффиноза	RAF	—	+	+	—	—	+	+
Целлобиоза	CEL	d	+	+	+	—	—	—
Ксилоза	XYL	—	—	—	—	—	+	d
Арабиноза	ARA	—	—	—	—	—	+	+
Сорбитол	SOR	—	+	—	+	—	—	—

Таблица 6 - АНАЭРОтест 23. Результаты

Род	культура I	культура II	культура III	культура IV	культура V
<i>Actinomyces</i>	56,52%	65,22%	56,52%	60,87%	69,57%
<i>Bifidobacterium</i>	91,30%	91,30%	65,22%	82,61%	91,30%
<i>Collinsella</i>	73,91%	78,26%	69,57%	60,87%	82,61%
<i>Eubacterium</i>	26,09%	34,78%	65,22%	65,22%	34,78%
<i>Eggerthella</i>	21,74%	30,43%	21,74%	65,22%	30,43%
<i>Lactobacillus</i>	73,91%	82,61%	73,91%	78,26%	69,57%
<i>Pseudoramibacter</i>	39,13%	39,13%	39,13%	73,91%	39,13%
<i>Propionibacterium</i>	47,83%	47,83%	47,83%	73,91%	47,83%

Идентификацию и дифференциацию микроорганизмов до вида по биохимическим признакам проводили с помощью Определителя бактерий Берджи (*Bergey's manual of systematic bacteriology, Second Edition, Volume Three, The Firmicutes*, 2009) (таблица 7).

Таблица 7 - Идентификация *Lactobacillus*
по Определителю бактерий *Bergey*

Проценты соответствия	культура I	культура II	культура III
99,9	<i>L. plantarum</i> <i>subsp. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. aviarius subsp.</i> <i>aviarius</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. kalixensis</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. manihotivorans</i>	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> <i>subsp. paracasei</i>
90 – 99	<i>L. agilis</i> , <i>L. plantarum</i> <i>subsp.</i> <i>argentoratensis</i>	<i>L. gallinarum</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> <i>subsp.</i> <i>kefirgranum</i> , <i>L. ruminis</i>	<i>L. fornicalis</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. zeae</i>

80 – 90	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>L. perolens</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. ultunensis</i>	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
70 – 80	<i>L. fornicalis</i> , <i>L. hamster</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. zeae</i>	<i>L. amylolyticus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. crispatus</i>	<i>L. agilis</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i>
60 – 70	<i>L. algidus</i> , <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> , <i>L. equi</i> , <i>L. intestinalis</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. murinus</i> , <i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> , <i>L. sakei</i> subsp. <i>carnosus</i>	<i>L. aviarius</i> subsp. <i>araffinosus</i> , <i>L. nagelii</i> , <i>L. pantheris</i> , <i>L. salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i> , <i>L. sharpeae</i>	<i>L. acetotolerans</i> , <i>L. acidipiscis</i> , <i>L. algidus</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. cypricasei</i> , <i>L. fuchuensis</i> , <i>L. hamster</i> , <i>L. intestinalis</i> , <i>L. kimchi</i> , <i>L.</i> <i>paralimentarius</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. perolens</i> <i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> , <i>L. sakei</i> subsp. <i>carnosus</i>
50 – 60	<i>L. alimentarius</i> , <i>L. animalis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fuchuensis</i> , <i>L. kimchi</i> , <i>L. paralimentarius</i>	<i>L. helveticus</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> , <i>L. kitasatonis</i> , <i>L. mindensis</i> , <i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> , <i>L. suntoreyus</i>	<i>L. bifermentans</i> , <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> , <i>L. equi</i> , <i>L. graminis</i> , <i>L. homohiochii</i>

40 – 50	<i>L. acetotolerans</i> , <i>L. acidipiscis</i> , <i>L. cypricasei</i>	<i>L. delbrueckii</i> <i>subsp. delbrueckii</i>	<i>L. animalis</i> , <i>L. murinus</i>
30 – 40	<i>L. bifermentans</i> , <i>L. coryniformis</i> <i>subsp. torquens</i> , <i>L. graminis</i> , <i>L. homohiochii</i> , <i>L. versmoldensis</i>	<i>L. delbrueckii</i> <i>subsp. indicus</i> , <i>L. amylophilus</i> , <i>L. saerimneri</i> , <i>L. satsumensis</i>	<i>L. paracasei</i> <i>subsp. tolerans</i> , <i>L. versmoldensis</i>
20 – 30		<i>L. delbrueckii</i> <i>subsp. bulgaricus</i> , <i>L. psittaci</i>	
10 – 20	<i>L. paracasei</i> <i>subsp. tolerans</i>	<i>L. iners</i>	

Первым признаком является определение типа молочнокислого брожения. При нем происходит распад глюкозы до молочной кислоты. Известны два типа брожения, вызываемого молочнокислыми бактериями:

1) гомоферментативное, при котором из глюкозы образуется только молочная кислота (*L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. amylolyticus*, *L. amylovorus*, *L. aviarius*, *L. crispatus*, *L. equi*, *L. farciminis*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. iners*, *L. johnsonii*, *L. kalixensis*, *L. kefiranofaciens*, *L. kitasatonis*, *L. mali*, *L. manihotivorans*, *L. mindensis*, *L. nagelii*, *L. pantheris*, *L. psittaci*, *L. ruminis*, *L. saerimneri*, *L. salivarius*, *L. satsumensis*, *L. sharpeae*, *L. suntoryeus*, *L. ultunensis*);

2) гетероферментативное, когда из глюкозы кроме молочной кислоты получают этанол и углекислый газ, которое в свою очередь подразделяется на факультативно-гетероферментативное (*L. acetotolerans*, *L. acidipiscis*, *L. agilis*, *L. algidus*, *L. alimentarius*, *L. animalis*, *L. bifermentans*, *L. casei*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, *L. cypricasei*, *L. fornicalis*, *L. fuchuensis*, *L. graminis*, *L. hamsteri*, *L. homohiochii*, *L. intestinalis*, *L. jensenii*, *L. kimchii*, *L. murinus*, *L. paracasei*, *L. paralimentarius*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. perolens*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. versmoldensis*, *L. zeae*) и

облигатно-гетероферментативное (*L. acidifarinae*, *L. antri*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. coleohominis*, *L. collinoides*, *L. diolivorans*, *L. durianis*, *L. ferintoshensis*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. frumenti*, *L. gastricus*, *L. hammesii*, *L. hilgardii*, *L. ingluviei*, *L. kefir*, *L. kunkeei*, *L. lindneri*, *L. malefermentans*, *L. mucosae*, *L. oris*, *L. panis*, *L. parabuchneri*, *L. paracollinoides*, *L. parakefiri*, *L. pontis*, *L. reuteri*, *L. rossii*, *L. sanfranciscensis*, *L. spicheri*, *L. suebicus*, *L. thermotolerans*, *L. vaccinostercus*, *L. vaginalis*, *L. zymae*).

Выделенная культура I на 99,9% соответствует *L. plantarum* subsp. *plantarum* и *L. paraplantarum*. Выделенная культура II – 99,9% *L. acidophilus*, *L. avarius* subsp. *aviarius*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. kalixensis*, *L. mali* и *L. manihotivorans*. Выделенная культура III – 99,9% *L. rhamnosus*, *L. casei* и *L. paracasei* subsp. *paracasei*.

Изученные микроорганизмы относятся к двум разным биохимическим группам: культура II, определяемая как вид *L. acidophilus*, относится к группе гомоферментативных *Lactobacillus*, а культуры I и III (виды *L. plantarum* и *L. rhamnosus* соответственно) – к группе факультативно-гетероферментативных *Lactobacillus*. Метаболизм сахаров у представителей этих групп принципиально отличается: в первом случае генетически детерминирован гликолитический путь, во втором – пентозофосфатный. В связи с приспособлением к обитанию в определенных условиях (рост в молоке и других средах, богатых питательными и ростовыми веществами, например, в кишечнике млекопитающих), бактерии молочнокислого брожения утратили способность к синтезу многих метаболитов, но приобрели свойства, позволяющие успешно колонизировать свою нишу и конкурировать в ней – способность утилизировать многие сахара, фосфоолигосахариды.

Гомоферментативные *Lactobacillus* не способны сбраживать пентозы, что подтверждено нашими исследованиями (таблица 8).

Таблица 8 - Сравнение результатов биохимического тестирования с данными по *Bergey's manual of systematic bacteriology, Second Edition, Volume Three, The Firmicutes, 2009*

Тесты	<i>L. plantarum</i> [Bergey]	культура I	<i>L. acidophilus</i> [Bergey]	культура II	<i>L. rhamnosus</i> [Bergey]	культура III
Тип ферментации глюкозы	B	B	A	A	B	B
Арабиноза	d	—		—	d	—
Галактоза		+	+	+		+
Ксилоза	d	—		—	—	—
Лактоза		+	+	+		+
Мальтоза		+	+	+		+
Маннитол	+	+	—	—	+	+
Манноза		+	+	+		+
Мелецитоза	+	+	d	+	—	—
Раффиноза	+	+	d	+	—	—
Салицин		+	+	+		+
Сахароза	+	+	+	+	+	+
Сорбитол	+	+		—	+	+
Трегалоза		+	d	+		+
Целлобиоза	+	+	+	+	+	+
Эскулин	+	+		+	+	+

Примечание: А – облигатно-гомоферментативные; В – факультативно-гетероферментативные.

Символы из *Bergey's manual of systematic bacteriology*: + = 90% и более штаммов положительны; — = 90% или более штаммов отрицательны; d = 11–89% штаммов положительны.

Из таблицы видно, что наибольшее количество субстратов утилизируют *Lactobacillus*, принадлежащие к группе факультативно-гетероферментативных *Lactobacillus*. Это связано с тем, что гомоферментативные *Lactobacillus* не способны сбраживать пентозы, а гетероферментативные микроорганизмы обладают двумя путями метаболизма сахаров, при этом сбраживание гексоз происходит по гликолитическому пути, а пентоз – по окислительному пентозофосфатному. При достаточном количестве гексоз их сбраживание идет по гликолитическому пути, а при снижении количества гексоз наличие в питательной среде пентоз индуцирует синтез фосфокетолазы.

Общие признаки для всех выделенных культур *Lactobacillus*: способность к ферментации лактозы, сахарозы, мальтозы, салицина, целлобиозы. Перечисленные особенности затрудняют идентификацию культур.

Биохимическим признаком для первичной дифференциации *Lactobacillus* является определение типа ферментации глюкозы (облигатно-гомоферментативные, факультативно-гетероферментативные, облигатно-гетероферментативные). Также признаками, позволяющими дифференцировать виды *Lactobacillus*, являются: способность утилизировать маннит, сорбит и раффинозу.

Если сравнивать культуры по количеству отличающихся биохимических признаков, то I и II культуры возможно дифференцировать только по 3 из 10 тестов, II и III – по 4, I и III – по 1.

Bifidobacterium сбраживают гексозы исключительно через фруктозо-6-фосфатный путь (таблица 9). Молочная и уксусная кислоты являются основными продуктами гексозного метаболизма. Ключевым ферментом *Bifidobacterium* при этом является тиаминдифосфат-зависимая фосфокетолаза. Этот фермент также служит важным таксономическим признаком при идентификации *Bifidobacterium* до рода, но не даёт возможности определить различия на видовом уровне.

Выделенная культура IV на 78,26% соответствует *B. bifidum*.

Выделенная культура V на 95,65% соответствует *B. longum*.

Таблица 9 - Сравнение результатов биохимического тестирования с данными по *Bergey's manual of systematic bacteriology, Second Edition, Volume Three, The Firmicutes*, 2009

Тесты	<i>B. bifidum</i> [Bergey]	культура IV	<i>B. longum</i> [Bergey]	культура V
индол	—	—	—	—
глюкоза	+	+	+	+
мальтоза	+	—	+	+
фруктоза	+	+	+	+
галактоза	+	+	+	+
лактоза	+	+	+	+
мелецитоза	—	—	+	+
уреаза	—	—	—	—
нитраты	—	—	—	—
сахароза	+	—	+	+
салицин	+	—	—	+
трегалоза	d	—	(—)	+
маннитол	d	—	—	—
рамноза	—	—	—	—
N-ацетил-β-D- глюкозаминидаза	d	+	d	+
β-глюкозидаза	+	+	+	+
эскулин	+	—	d	—
манноза	d	—	d	+
раффиноза	+	—	+	+
целлобиоза	d	—	—	—
ксилоза	—	—	d	+
арабиноза	—	—	+	+
сорбитол	d	—	—	—

Примечание: + = положительная реакция; — = отрицательная реакция; (+) = большей частью положительная реакция; (—) = большей частью отрицательная реакция; d = вариабильная реакция.

Признаками, позволяющими дифференцировать виды *Bifidobacterium*, являются: способность утилизировать мелецитозу, салицин, трегалозу, маннитол, эскулин, целлобиозу, ксилозу, арабинозу, сорбитол.

Практический и научный интерес представляет изучение способности *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* к утилизации раффинозы. Этот углевод относится к группе фосфоолигосахаридов (ФОС), используется в составе пробиотических препаратов в качестве пребиотического компонента. Способность к утилизации этого олигосахарида зависит от наличия или отсутствия специфических гликозилгидролаз. Раффинозу утилизировали штаммы, относящиеся к виду *L. plantarum* и *L. acidophilus*, *B. bifidum* и *B. longum*, у вида *L. rhamnosus* утилизации этого олигосахарида не наблюдалось.

Таким образом, видовая принадлежность выделенных штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, определенная по совокупности морфотинкториальных, культуральных и биохимических признаков, нуждалась в подтверждении другими методами.

3.2. Идентификация *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* с помощью ПЦР-анализа

Как уже было сказано, представители родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* являются близкородственными видами и, как показало наше исследование, их дифференциация традиционными биохимическими методами вызывает некоторые затруднения. Молекулярные методы, в частности ПЦР-анализ с видоспецифическими праймерами, помогают преодолеть многие ограничения фенотипических методов. Самое главное, молекулярные методы являются сравнительно легкими, точными, эффективными, облегчают труд исследователей, обладают высокой и дискриминационной воспроизводимой способностью, требуют меньше времени, позволяют определить несколько видов в одном анализе, в связи с чем являются полезным инструментом для клинических исследований.

С помощью метода ПЦР были идентифицированы до вида культуры, выделенные на питательных средах.

По данным ПЦР-детекции бактерии I – III относятся к роду

Lactobacillus. Положительные результаты были получены при амплификации ДНК, выделенной от культуры I, и видоспецифичными праймерами к *L. plantarum*, ДНК от культуры II и праймерами к *L. acidophilus*, ДНК от культуры III и праймерами к *L. rhamnosus*.

По данным ПЦР-детекции бактерии IV и V относятся к роду *Bifidobacterium*. Положительные результаты были получены при амплификации ДНК, выделенной от культуры IV, и видоспецифичными праймерами к *B. bifidum*, ДНК от культуры V и праймерами к *B. longum* (таблица 10).

Таблица 10 - Результаты ПЦР-детекции *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*

Праймеры	Культура I	Культура II	Культура III	Культура IV	Культура V
<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	+	+	+	—	—
<i>L. acidophilus</i>	—	+	—	—	—
<i>L. brevis</i>	—	—	—	—	—
<i>L. brevis 2</i>	—	—	—	—	—
<i>L. casei</i>	—	—	—	—	—
<i>L. delbrueckii</i>	—	—	—	—	—
<i>L. fermentum</i>	—	—	—	—	—
<i>L. plantarum</i>	+	—	—	—	—
<i>L. rhamnosus</i>	—	—	+	—	—
<i>L. rhamnosus 2</i>	—	—	+	—	—
<i>Bifidobacterium</i> <i>spp.</i>	—	—	—	+	+

Продолжение таблицы 10

<i>B. adolescentis</i>	—	—	—	—	—
------------------------	---	---	---	---	---

<i>B. adolescentis</i> 2	—	—	—	—	—
<i>B. angulatum</i>	—	—	—	—	—
<i>B. animalis</i>	—	—	—	—	—
<i>B. bifidum</i>	—	—	—	+	—
<i>B. bifidum</i> 2	—	—	—	+	—
<i>B. breve</i>	—	—	—	—	—
<i>B. longum</i>	—	—	—	—	+
<i>B. longum</i> 2	—	—	—	—	+

Полученные результаты соответствуют изначально предполагаемым данным о наличии определенных видов бактерий в пробиотиках.

Таким образом, на чистой культуре *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* показана высокая специфичность праймеров, используемых для родовой детекции *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. и межвидовой дифференциации штаммов *L. plantarum*, *L. acidophilus* и *L. rhamnosus*, *B. bifidum* и *B. longum*, и именно их следует использовать в дальнейшей работе по дифференциальной диагностике *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* (рис.12).

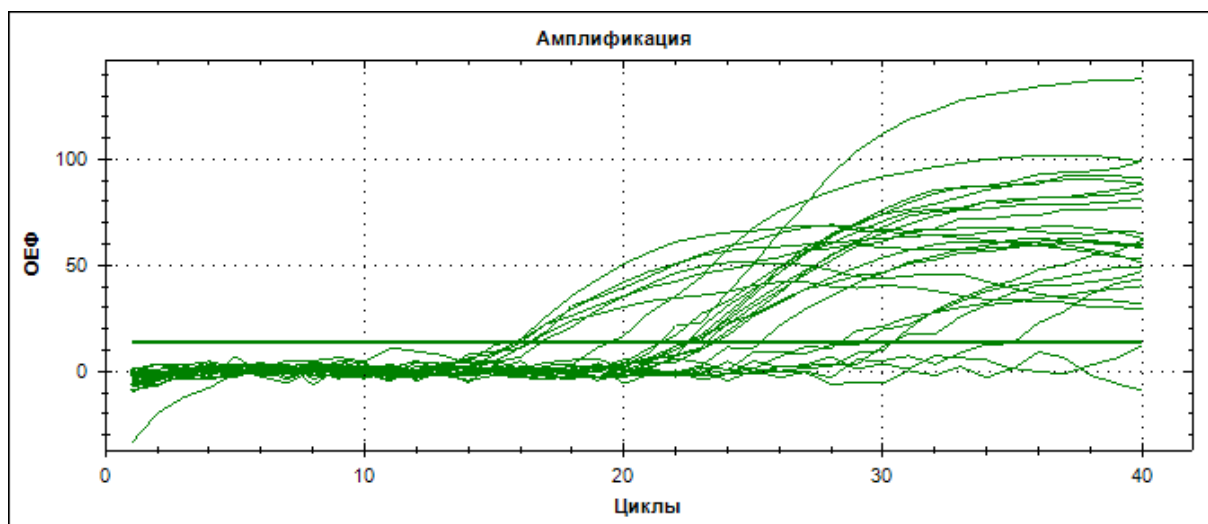


Рисунок 12 - Результаты амплификации ДНК, выделенных из полученных культур *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, с родоспецифичными праймерами

3.3. Идентификация *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* методом MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа

Следующим этапом нашей работы явился анализ результативности использования MALDI-TOF масс-спектрометрического метода для характеристики близкородственных видов представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также определение масс-спектров, представляющих собой надежные маркеры для их межвидовой дифференциации.

Все исследуемые штаммы были изучены методом MALDI-TOF масс-спектрометрии на масс-спектрометре с помощью анализатора микроорганизмов BioMerieux VITEK MS MALDI TOF. Экстракция белков осуществлялась непосредственно на одноразовом слайде с использованием готового матрикса для VITEK MS. Интерпретация результатов проводилась на базе данных VITEK MS, разработанной на платформе компании AnagnosTec и состоящей из клинически значимых видов с использованием Расширенного Классификатора Спектров (таблица 11).

Таблица 11 - Результаты идентификации на масс-спектрометре BioMerieux VITEK MS MALDI TOF

N	Название организма	Показатель достоверности
Культура I	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
Культура II	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	99,9
Культура III	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99,9
Культура IV	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	99,9
Культура V	<i>Bifidobacterium longum</i>	99,9

Таким образом, MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ является высоковоспроизводимым методом для эффективной идентификации

Lactobacillus и *Bifidobacterium*. Метод позволяет дифференцировать представителей рода *Lactobacillus*, в частности *L. plantarum*, *L. acidophilus* и *L. rhamnosus*, а также рода *Bifidobacterium*, в частности *B. bifidum* и *B. longum* (рис. 13 -17).

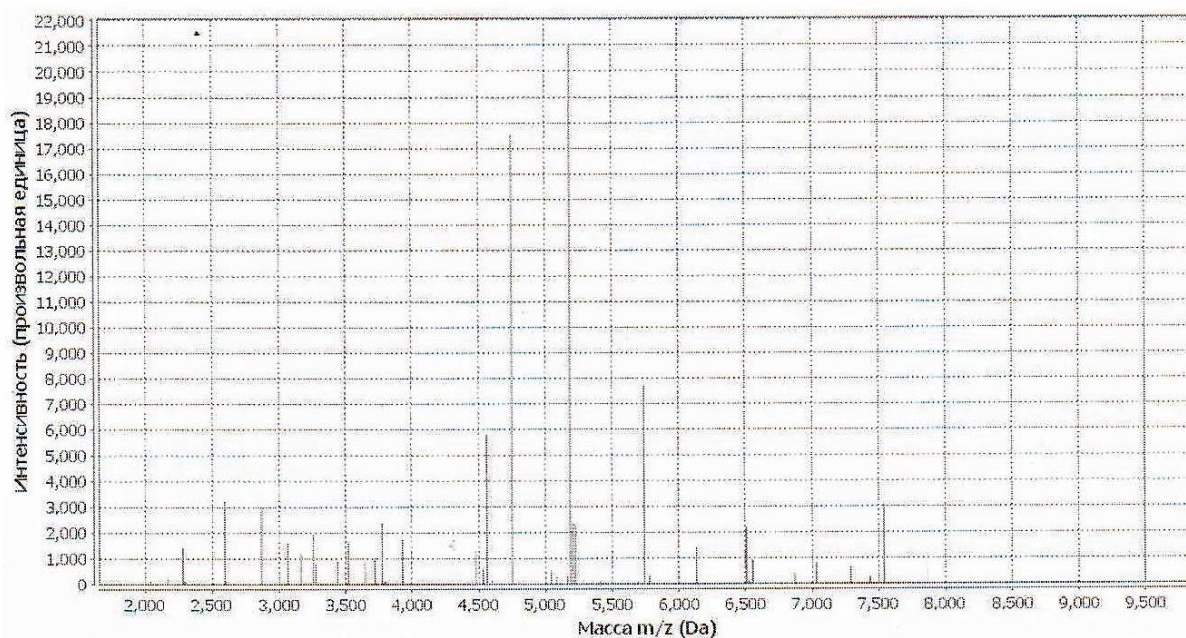


Рисунок 13 - Масс-спектр культуры I - *Lactobacillus acidophilus*

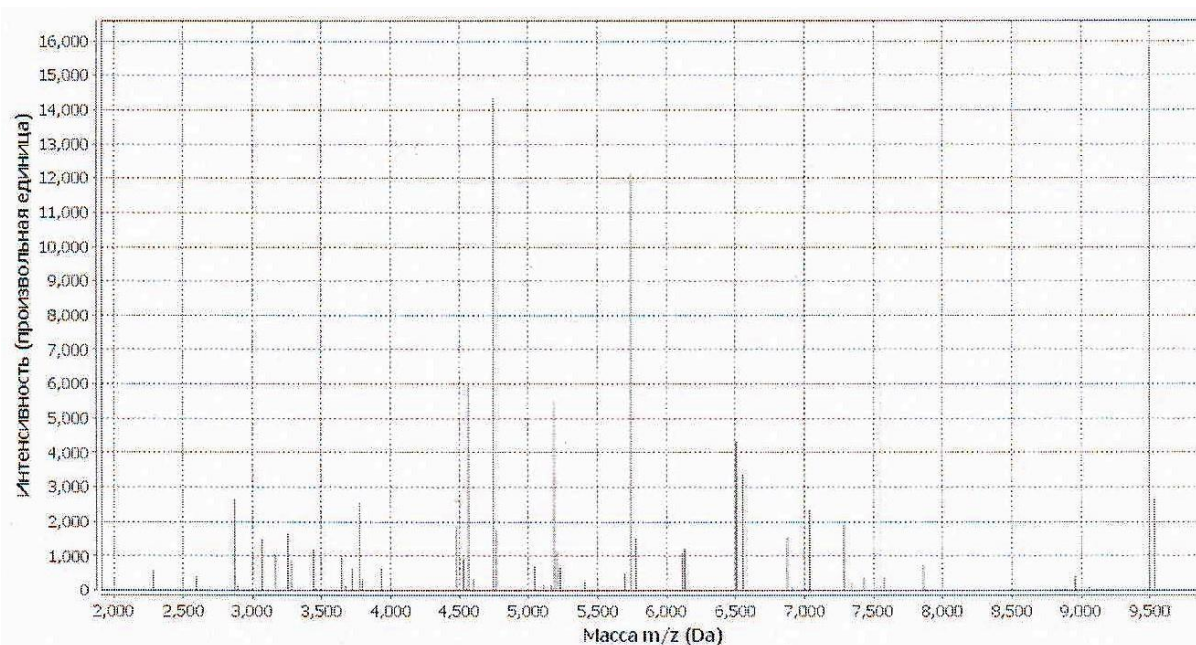


Рисунок 14 - Масс-спектр культуры II - *Lactobacillus plantarum*

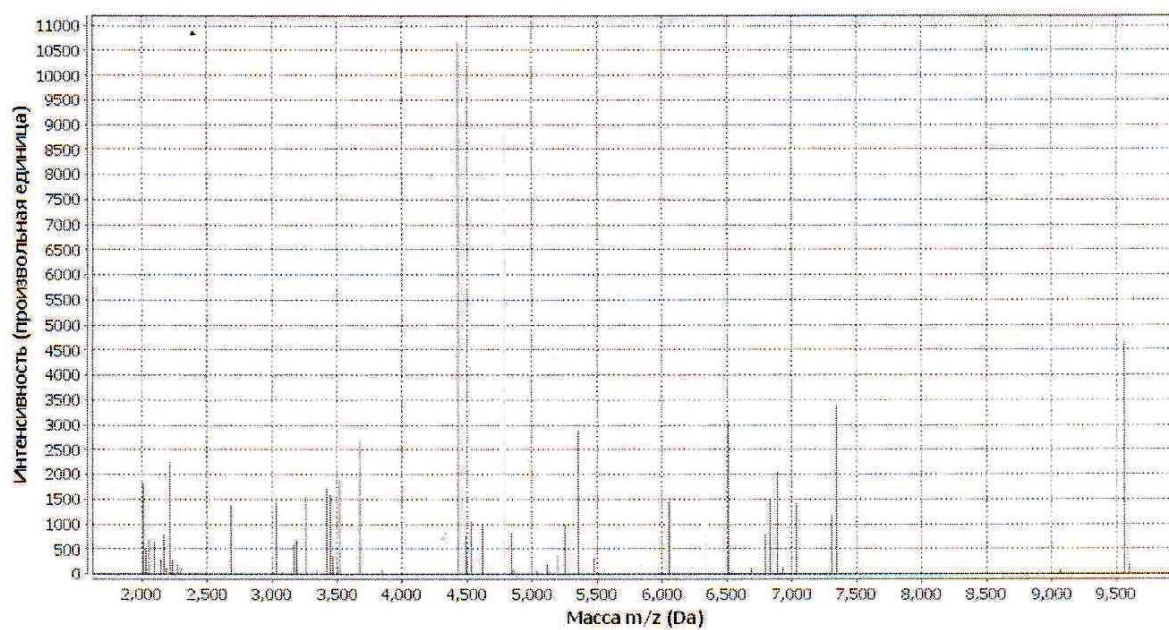


Рисунок 15 - Масс-спектр культуры III - *Lactobacillus rhamnosus*

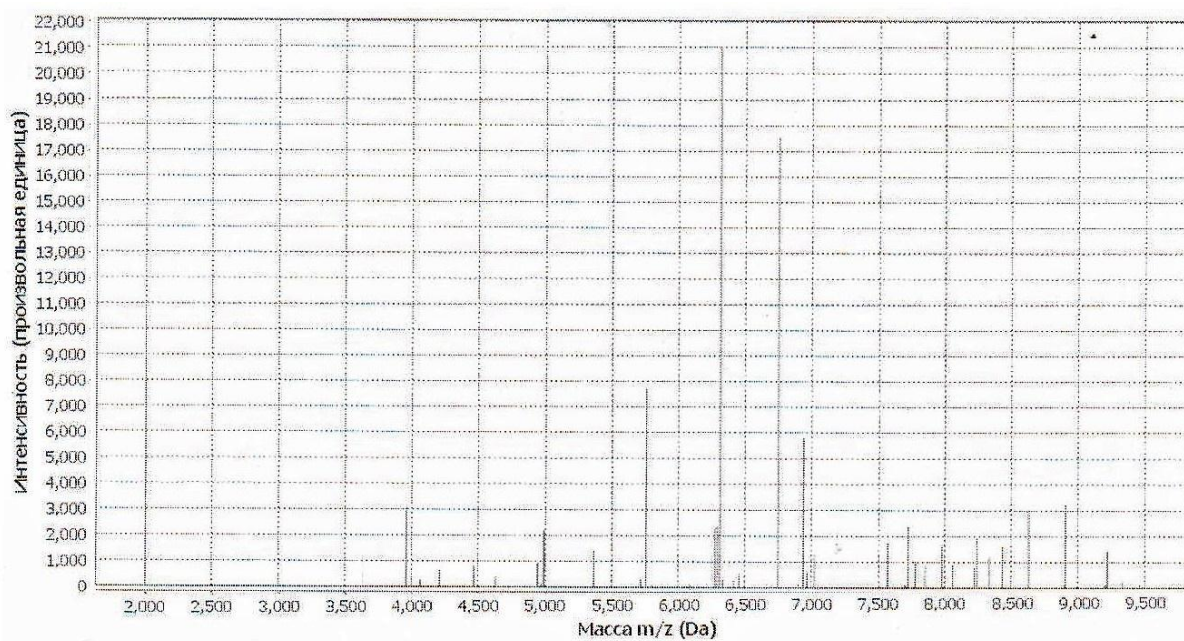


Рисунок 16 - Масс-спектр культуры IV - *Bifidobacterium bifidum*

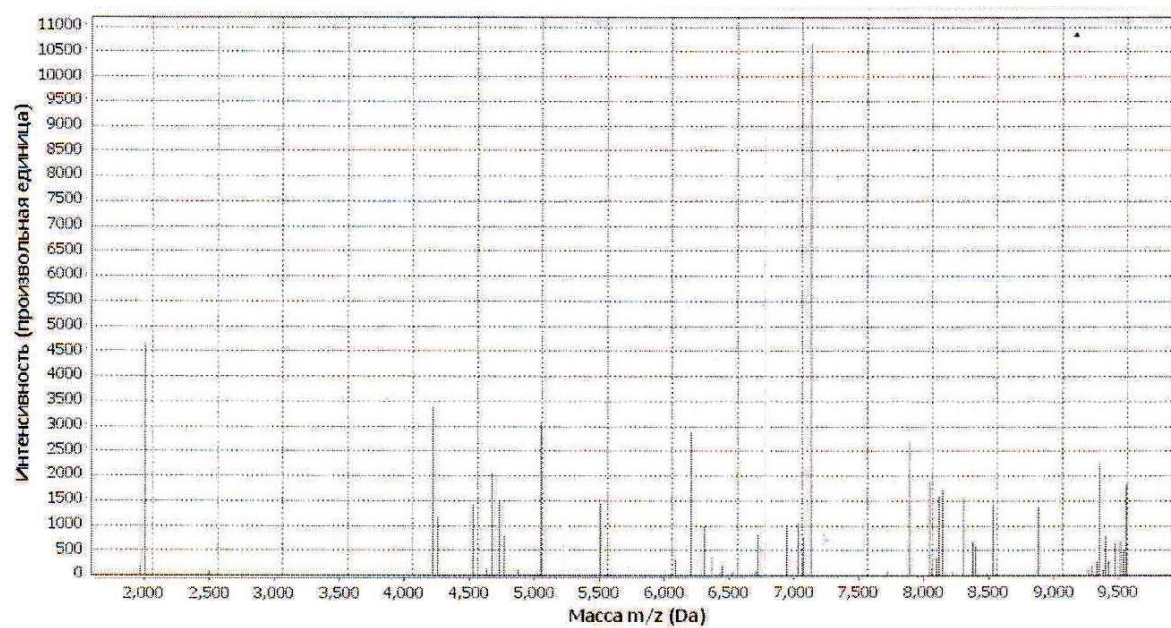


Рисунок 17 - Масс-спектр культуры V - *Bifidobacterium longum*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Во всем мире для характеристики близкородственных видов родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* используются различные методы. Однако, до настоящего времени не был определен единый стандартизированный подход. Поэтому мы провели сравнительную оценку эффективности биохимического метода, ПЦР-анализа и масс-спектрометрии для дифференциации близкородственных видов. Анализ результативности методов дифференциации проведен на видах *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum* и *B. longum* (таблица 12).

Таблица 12 - Результаты идентификации культур тремя методами

Культура	Вид по результатам		
	Биох. тесты	ПЦР	Масс-спектрометрия
I	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> или <i>L. paraplantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
II	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. avarius</i> subsp. <i>aviarius</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. kalixensis</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. manihotivorans</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
III	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
IV	78,26% <i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
V	95,65% <i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>

Таким образом, в ходе данной работы проведена сравнительная оценка эффективности методов дифференциации представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* на большой коллекции, различные виды *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum* и *B. longum*. При этом показано, что

биохимические тесты не всегда являются достаточными для дифференциации. Фенотипическая идентификация имеет ряд существенных недостатков: субъективность выбора и ограниченность набора изучаемых таксономических признаков и их оценки; высокая изменчивость микроорганизмов; малая информативность (фенотипически проявляется только 5-20 % информации генома); трудоемкость, высокие требования к уровню квалификации персонала, сравнительно низкая стандартизация. В результате по классическим фенотипическим свойствам ошибочно идентифицируется до 30-50 % культур. Поэтому ручная стандартная фенотипическая идентификация бактерий сложна, продолжительна, ненадежна и не соответствует современным потребностям клинической лаборатории.

Полученные результаты подчеркивают необходимость внедрения молекулярных методов идентификации представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, что позволит избежать неверных результатов, которые могут возникнуть при исследованиях, основанных на биохимических характеристиках и снизить трудозатраты.

ПЦР имеет несомненные преимущества: прямое определение возбудителя, высокие специфичность, чувствительность, скорость исследования, универсальность. Однако, при всей доступности и привлекательности, метод полимеразной цепной реакции имеет недостатки: риск контаминации образцов во время пробоподготовки, ведущий к получению ложноположительных результатов; ингибция реакции гибридизации гепарином; невозможность оценки жизнеспособности обнаруженного микроорганизма. Также метод имеет ограничения и существует вероятность получения ложноотрицательных результатов, так как выявляются только ДНК бактерий, внесенные в методику, подбор праймеров осуществляется к 16S рРНК определенного вида микроорганизма, в то время как даже при наличии праймеров к большому спектру бактерий, ни одна из реакций может не дать положительный результат, а значит эксперимент придется начинать заново. Также следует учитывать, что исследования

международного проекта Human microbiome («Микробиом человека») еще не завершены и геном многих возбудителей не секвенирован, а значит не занесены в GenBank.

Современные научные исследования доказали, что состав белков, как и липидов бактериальной клетки, детерминирован генетически, что позволяет использовать их для надежной идентификации микроорганизмов. MALDI-TOF MS идентификация микроорганизмов основана на определении уникального для каждого вида микроорганизмов набора белков – своеобразный «отпечаток пальца» (фингерпринтинг) микроорганизма, «протеомная дактилоскопия». Идентификация осуществляется в основном по рибосомальным белкам, которые присутствуют во всех микроорганизмах.

Преимущества масс-спектрометрического анализа несомненны: позволяет отказаться от длительной, трудоемкой и ненадежной фенотипической идентификации; невысокие требования к квалификации персонала; не требуется специальных расходных материалов; быстрая и простая пробоподготовка; высокая чувствительность – 10^4 - 10^5 клеток – единичная колония или центрифугат жидкой культуры; высокая скорость идентификации; снижение себестоимости каждого исследования в 12-96 раз в сравнении с фенотипическими методами.

Самое главное достоинство – это возможность видовой идентификации любых видов культивируемых микроорганизмов (нет необходимости заранее предполагать вид выделенной культуры) и высокая точность идентификации до вида, которая превышает 98 %.

Однако, для исследования необходимо предварительно выделить чистую культуру возбудителя, что увеличивает продолжительность исследования. Использование данного метода идентификации при работе со смешанной популяцией микроорганизмов ограничено еще и тем, что после высева пробы жидкой культуры на плотную питательную среду, для установления соотношения бактерий двух разных видов необходимо выделить чистую культуру и исследовать все колонии, выросшие на поверхности среды,

что существенно увеличивает экономические и трудовые затраты. Актуальным вопросом является поиск более эффективного метода для решения поставленной задачи.

Поэтому для видовой идентификации указанных видов целесообразно использовать при оснащении лаборатории необходимым оборудованием методы идентификации, такие как ПЦР-анализ с видоспецифичными праймерами и MALDI-TOF масс-спектрометрия. Внедрение метода масс-спектрометрии в рутинную практику идентификации и дифференциации *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* требует дополнительных исследований биомаркеров и создание баз данных коллекционных штаммов.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что классические бактериологические методы в связи с вариабельностью признаков и большим фенотипическим сходством представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* не являются достаточными для их эффективной дифференциации и идентификации, а могут быть использованы только для выделения возбудителя в чистой культуре из исследуемого материала. Поэтому для подтверждения видовой принадлежности биохимические тесты могут быть заменены на ПЦР-анализ с видоспецифичными праймерами и метод MALDI-TOF -MS.

2. Совокупность методов классической бактериологии, MALDI-TOF-MS анализа и ПЦР позволила выявить микроорганизмы родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Метод MALDI-TOF-MS оказался наиболее эффективным и достоверным способом видовой идентификации представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

3. На чистой культуре *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* показана высокая специфичность праймеров, используемых для родовой детекции *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. и межвидовой дифференциации штаммов *L. plantarum*, *L. acidophilus* и *L. rhamnosus*, а также *B. bifidum* и *B. longum*, и именно их следует использовать в дальнейшей работе по дифференциальной диагностике *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

4. Определены молекулярные маркеры (масс-пики) и проведена межвидовая дифференциация коллекции штаммов *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum* и *B. longum* с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии.

5. Охарактеризованы штаммы *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum* и *B. longum* по широкому набору фено- и генотипических признаков и депонированы в рабочей коллекции кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ, которые могут быть использованы в качестве тест-штамма при создании пробиотических препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арттюхова С.И., Зверева О.А. Изучение биотехнологических свойств *Bifidobacterium longum* для производства биологически активных добавок // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2014. - №8. - С.132.
2. Афанасьев М.В. Апробация метода масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для идентификации возбудителей чумы // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – №8. – С.39-43.
3. Бондаренко В.М. Молекулярно-генетические исследования лактофлоры человека и животных // Ветеринарная патология. – 2005. - №3. – С.41-49
4. Бондаренко В.М. По поводу нового подхода к классификации фармакопейных лекарственных пробиотических препаратов, биологически активных добавок к пище и продуктов функционального питания // Фарматека. - 2007. - Т.2. - N137. - С.62-64.
5. Ботина С.Г., Коробан Н.В., Климина К.М. и др. Генетическое разнообразие бактерий рода *Lactobacillus* из гастроинтестинальной микробиомы людей //Генетика. - 2010. - Т. 46. - №12. - С.158-159.
6. Ботина С.Г., Червинец Ю.В., Климина К.М. и др. Генетическая идентификация антагонистически активных штаммов лактобацилл, выделенных из полости рта здоровых людей // Клиническая лабораторная диагностика. - 2010. - №11. - С.43-46.
7. Ганина В.И., Лысенко А.М., Гуреева Ю.В., Калинина Н.А. Изучение антагонистической активности и идентификация бифидобактерий и молочнокислых палочек, рекомендуемых для получения продукта лечебно-профилактического назначения и пробиотиков // Биотехнология. - 1999. - N2. - С.15-21.
8. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл //

Бюллетень сибирской медицины. -2003. - № 4. - С.50-58.

9. Домотенко Л.В., Шепелин А.П. Бифидум-среда для выделения и культивирования бифидумбактерий // Инфекция и иммунитет. - 2014. - Т.4. - №3. - С.279-283.

10. Доронин А.Ф., Шендеров Б.А. Функциональное питание. - М.: Грантъ, 2002. - 296с.

11. Калмыкова А.И., Селятицкая В.Г., Пальчикова Н.А. и др. Клеточные и системные механизмы действия пробиотиков. - Новосибирск: ОАО Новосибирское книжное издательство, 2007. - 280с.

12. Карпушина С.Г., Тюрин М.В., Иванов А.А. и др. Выделение, идентификация и некоторые биологические свойства бифидобактерий из кишечника человека // Биотехнология. - 1998. - N2. - С.28-36.

13. Квасников Е.И., Нестеренко О.Л. Молочнокислые бактерии и пути их использования. - М.: Наука, 1975. - 389с.

14. Кирилюк А.А. Применение методов масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) в современной клинической лаборатории – обзор приложений, преимущества использования, современные подходы и возможности автоматизации // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – №9. – С.92-93.

15. Корноухова Л.Л. Результативность применения масс-спектрометрии при автоматизации микробиологической диагностики //Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – №9. – С.73.

16. Кругликов В.Д. Разработка критериев отбора пробиотических бактерий для расширения спектра доступных противохолерных средств // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. - Вып.114. - С.69-72.

17. Кузнецова Т.В., Кебекбаева К.М., Джакибаева Г.Т. и др. Генотипирование штамма молочнокислых бактерий методом ПЦР-анализа // Современные проблемы науки и образования. – 2016. №5 – С.327

18. Ленцнер АА., Ленцнер Х.П., Микельсаар М.Э. и др. Лактофлора и колонизационная резистентность // Антибиотики и медицинская

биотехнология. - 1987. - Т. 32. - № 3. - С.173-179.

19. Назаров А.П. Эффект полной автоматизации работы микробиологической лаборатории в условиях российского стационара // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – №9. – С.70-71.

20. Новокшенов А.А. , Соколова Н.В. Физиологические функции лактобактерий в организме и эффективность их применения в составе пробиотиков в педиатрической практике // Эффективная фармакотерапия. Эпидемиология и инфекции. – 2012. - №1. - стр.52-56.

21. Онищенко Г.Г., Алешкина В.А., Афанасьева С.С. и др. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии. - М.: ГОУ ВУНМЦ Минздрава РФ, 2002. - 608с.

22. Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р., Бурменская О.В. и др. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – №1. – С.4-9.

23. Салгина А.В., Бондаренко Т.А., Иванова Е.В. и др. Сравнение методов идентификации представителей рода *Bifidobacterium* // Вестник ОГУ. – 2014. - №13. – С.92-95

24. Саркисов С. Э., Коршунов В.М., Семянов В.В. и др. Изучение антагонистической активности бифидобактерий *in vitro* и *in vivo* с использованием гнотобиологической технологии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1999. - N5. - С.72-77.

25. Современная микробиология: прокариоты: Справ. руководство: В 2т. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - Т.1. Пер с англ. - 496с.

26. Соловьева И.В., Точилина А.Г., Белова И.В. и др. Биологические свойства лактобацилл. Перспективы использования в лабораториях Роспотребнадзора экспресс-методов амплификации нуклеиновых кислот при контроле качества пищевых продуктов, БАД к пище, лекарственных форм, содержащих лактобациллы (Аналитический обзор) // МедиАль. – 2014. - №2. –

С.29-44.

27. Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Водяницкая С.Ю. и др. Применение масс-спектрометрического метода MALDITOF для межвидовой дифференциации близкородственных вибрионов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – №8. – С.27-38.

28. Точилина А.Г., Белова И.В., Соловьева И.В. и др. Изучение биологических свойств штаммов рода *Lactobacillus* // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №5. – С.631

29. Тюрин М.В., Шендеров Б.А., Рахимова Н.Г. и др. К механизму антагонистической активности лактобацилл // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1989. - №2. - С.3- 8.

30. Хавкин А.И. Микрофлора пищеварительного тракта. - М.: Фонд социальной педиатрии, 2006. - 416с.

31. Харитонов В.Д., Филатов Ю.И., Мищенко Д.С. и др. Лактулоза: назначение и использование // Молочная промышленность. - 2000. - N7. - С.16-19.

32. Харченко Н.В. Выделение бифидобактерий и изучение их пробиотических свойств при длительном хранении: Дис. ... канд.биол. наук: 03.02.03 / МГУ им. Ломоносова. - М., 2016. - 141с.

33. Храмцов А.Г., Евдокимов И.А., Рябцева С.А. и др. Применение бифидогенных факторов при производстве пищевых и кормовых добавок // Известия вузов. Пищевая технология. - 1998. - N4. - С.56-57.

34. Чаплин А.В., Бржозовский А.Г., Парфенова Т.В. и др. Изучение видового разнообразия бактерии рода *Bifidobacterium* кишечной микрофлоры с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2015. - N4. - С.435-440.

35. Шевелева С.А. Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса // Вопросы питания. - 1999. - N2. - С.32-39.

36. Шкопоров А.И., Ефимов Б.А., Володин Н.Н. и др.

Бифидобактерии: традиционный взгляд и современные генетические исследования // Вопросы практической педиатрии. -2007. - Т. 2. - Вып.5. - С.76-79.

37. Шульпекова Ю.О. Применение пробиотиков в клинической практике // Русский медицинский журнал. - 2003. -Т. 5. - N1. - С.15-18.

38. Эрвольдер Т.М., Гудкова М.Я., Семенова Л.П. и др. Совместное развитие бифидобактерий и молочнокислых микроорганизмов в молоке // Биологические и физико-химические исследования в маслоделии и сыроделии. - Углич, 1986. - С.87-91.

39. Besselink M.G.H. Probiotic prophylaxis in acute pancreatitis: prudence required szen // Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. - 2009. - №6. - P.E3-6.

40. Biavati B., Mattarelli P. The family *Bifidobacteriaceae* // The prokaryotes. 3rd ed. New York: Springer. - 2006. - Vol.3. - P.322-382.

41. Biavati B., Vescovo M., Torriani V. *Bifidobacteris*: histoty, ecology, physiology and applications // Ann Microbiol. -2000. - Vol.50. - P.117-131.

42. Boekhorst J., Helmer Q., Kleerebezem M. et al. Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria // Microbiol. - 2006. - Vol.152. - P.273-280.

43. Boirivant M. The mechanism of action of probiotics // Curr. Opin. Gastroenterol. - 2007. - №23. - P.679-692.

44. Borivant M., Strober W. The mechanism of action of probiotics // Curr. Opin. Gastroenterol. - 2007. - Vol.23 (6). – P.679-692.

45. Bjork L. The lactoperoxidase system // Natural Antimicrobial Systems. IDF- Brussels - 1985. - P.18-30.

46. Carbonnelle e., Grohs P., Jacquier h., Day n., Tenza s., Dewailly A. et al. Robustness of two MALDi-toF mass spectrometry systems for bacterial identification // J. Microbiol. Meth. – 2012. - №89(2) - P.133–6.

47. Clark A.e., Kaleta e.J., Arora A., Wolk D.M. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology // Clin. Microbiol. Rev. – 2013 - №26 -

P.547-603.

48. Clark P.A., Martin J.H. Selection of *bifidobacteria* for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: - Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines // Cultured Dairy Products Journal. - 1994. - Vol.29, N3. - P.18-21.

49. Coconnier M.H., Klaenhammer T.R., Kernöis S. et al. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture // Appl. Environ. Microbiol. - 1992. - Vol. 58, №6. - P.2034-2039.

50. Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen // FEMS Microbiology Reviews. - 1987. - №46. - P.269-280.

51. Croxatto A., Prodhom G., Greub G. Applications of MALDI-toF mass-spectrometry in clinical diagnostic microbiology // FEMS Microbiol. Rev. – 2012. - №36(2). - P.380-407.

52. Dodds K.L., Collins-Thompson D.L. Nitrite tolerance and nitrite reduction in lactic acid bacteria associated with cured meat products // Int. J. Food Microbiol. - 1984. - Vol.1, №3. - P.163-170.

53. Fan W., Huo G., Li X., Yang L., Duan C., Wang T., Chen J. Diversity of the intestinal microbiota in different patterns of feeding infants by Illumina high-throughput sequencing // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2013. - № 29 (12). - P.2365-2372.

54. Favier C.F., Vaughan E.E., De Vos W.M., Akkermans A.D.L. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates // Applied and Environmental Microbiology. - 2002. - Vol.68, N1. - P.219-226.

55. Fedorak R.N. Probiotics in the treatment of human inflammatory bowel diseases: update 2008 // J Clin Gastroenterol. -2008. - №42. - P.97-103.

56. Felis G.E., Dellaglio F. Taxonomy of *lactobacilli* and *bifidobacteria* // Curr Issues Intest Microbiol. - 2007. - Vol.8. - P.44-61.

57. Fenselau C., Demirev P.A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry // Mass Spectrom. Rev. - 2001. - Vol.20. - P.157-

171.

58. German J.B., Freeman S.L., Lebrilla C.B., Mills D.A. Human milk oligosaccharides: evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria // Nestle Nutritional Workshop Ser Pediatr Program. - 2008. - Vol.62. - P.205-222.

59. Gilliland S.E., Speck M.L. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures // J. Food Protect. - 1977. - Vol.40, №12. - P.820-823.

60. Hammes W.P., Hertel C. The genus of *Lactobacillus* and *Carnobacterium* // Springer-Verlag. New-York. Edition 2. - 1992. - Vol.4.

61. Jakobsson H.E., Abrahamsson T.R., Jenmalm M.C., Harris K., Quince C., Jernberg C. Björkstén B. Engstrand L., Andersson A.F. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section // Gut. – 2014. - №63 (4). - P.559-566

62. Jay J.M. Antimicrobial properties of diacetyl // Appl. Environ. Microbiol. - 1982. - №44. - P.525-532.

63. Kanatani K., Tahara T., Oshimura M. et al. Identification of the replication region of *Lactobacillus acidophilus* plasmid pLA102T // FEMS Microbiology Letters - 1995. - Vol.133, №2. - P.127-130.

64. Kebary K.M.K. Production partial purification and stability of antimicrobial substances produced by *Bifidobacterium bifidum* DI. // Egypt J of Dairy Sci. - 1995. - Vol.23, N2. - P.151-166.

65. Kleerebezem M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis // Peptides. - 2004. - Vol.25, №9. - P.1405-1414.

66. *Lactobacillus*. Molecular biology From Genomics to Probiotics / Edited by Ljungh A., Wadstrom T. – UK: Caister Academic Press, 2009. – P.205

67. Lavigne J.-P., Espinal P., Dunyach-Remy C. et al. Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? // Clin. Chem. Lab Med. - 2013. - Vol.51, № 2. - P.257-270.

68. Leahy S., Higgins D., Fitzgerald G., van Sinderen D. Getting better with bifidobacteria // J.Appl Microbiol. - 2005. -Vol.98. - P.1303-1315.
69. Matsuki T. et al. Use of 16S rRNA-genetargeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces // Appl. Environ. Microbiol. - 2004. - Vol.70, N.12. - P.7220-7228.
70. Mayo B., van Sinderen D. Bifidobacteria: Genomics and Molecular Aspects. - Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2010. - P.260 p.
71. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response // Nature. - 2007. - №449. - P.819-826.
72. Okamoto M., Benno Y., Leung K.P. et al. *Bifidobacterium* tsurumiense sp. nov., from hamster dental plaque // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2008. - Vol.58. - P.144-148.
73. Price R.J. Lee J.S. Inhibition of Pseudomonas species by hydrogen peroxide producing lactobacilli // J. Milk Food Technol. - 1970. - Vol.3, №1. - P.13-18.
74. Ringel-Kulka T., Cheng J., Ringel Y., Salojarvi J., Carroll I., Palva A., de Vos W.M., Satokari R. Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults a high throughput microarray analysis // PLoS One. – 2013. - № 8 (5): 64315.
75. Satokari R.M., Vaughan E.E., Smidt H. et.al. Molecular approaches for the detection and identification of *bifidobacteria* and *lactobacilli* in the human gastrointestinal tract // Syst. Appl. Microbiol. - 2003. - Vol.26, N4. - P.572-584.
76. Sauer S., Freiwald a., Maier T., Kube M., Reinhardt R., Kostrzewa M. et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis // PLoS One. – 2008. - №3(7) - P.2843.
77. Silva F.V., Bambirra E.A., Olivera A.L., Souza P.P., Gomes D.A., Vieira E.C., Nicoli J.R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with Salmonella enteritidis subsp. typhimurium in conventional and gnotobiotic mice // J. Appl. Microbiol. - 1999. - Vol.8, N2. - P.331-336.
78. Tamime A.Y., Marshall V.M.E., Robinson R.K. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria // Journal of Dairy

Research. - 1995. - Vol.62. - P.151-187.

79. Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis* // Appl. Environ. Microbiol. - 1999. - Vol.65, №10. - P.4351-4356.

80. Turrioni F., Peano C., Pass D.A., Foroni E., Severgnini M., Claesson M.J., Kerr C., Ventura M. Diversity of *bifidobacteria* within the infant gut microbiota. - PLoS One. – 2012. - №7 (5): 36957.

81. Ventura M., Zink R. Rapid identification, differentiation and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis* // Appl. Environ. Microbiol. - 2002. - Vol.68. - P.6429-6434.

ОТЗЫВ

научного руководителя на выпускную квалификационную (дипломную) работу студента 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. – Биология медико-профилактического факультета с отделением микробиологии **Сунгатуллиной Гульнары Энверовны** на тему «Сравнительная оценка информативности полимеразной цепной реакции и MALDI-TOF масс-спектрометрии при идентификации представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*».

Студентка Сунгатуллина Г.Э. проходила дипломную практику на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии Башкирского государственного медицинского университета.

Во время практики проявила ответственность и исполнительность, изучила источники литературы отечественных и зарубежных авторов, показала высокий уровень владения теоретическими положениями по выбранной теме исследования.

Студентка показала хорошую практическую подготовку, овладела микробиологическими методами исследования, такими как культивирование в анаэробных условиях, получение чистых культур, окраска по Граму и биохимические тесты, освоила методику проведения ПЦР в режиме реального времени и MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ, умело применяет их в практической деятельности.

Проявила хорошую теоретическую подготовку, навыки самостоятельной работы и трудолюбие.

Сунгатуллина Г.Э. является участником III Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы современных исследований» и соавтором 1 статьи в журнале «Научно-практические исследования».

Работа выполнена и рекомендуется к защите.

Научный руководитель:
д.м.н., профессор


(подпись)

А.Р. Мавзютов

Научный консультант:
аспирант


(подпись)

А.В. Цветкова

«19» июня

2017 г.

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную (дипломную) работу студента 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. – Биология медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
Сунгатуллиной Гульнары Энверовны

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Сравнительная оценка информативности полимеразной цепной реакции и MALDI-TOF масс-спектрометрии при идентификации представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*».

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

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

Дипломная работа Сунгатуллиной Г.Э. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к дипломным работам, и может быть допущена к защите.

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


(подпись)

А.Х. Баймиев

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную (дипломную) работу студента 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. – Биология медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
Сунгатуллиной Гульнары Энверовны

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Сравнительная оценка информативности полимеразной цепной реакции и MALDI-TOF масс-спектрометрии при идентификации представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*».

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

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

В работе есть логичность изложения анализа, текст в исследовании полностью соответствует названиям разделов. Автор продемонстрировал отличный уровень владения теоретическими понятиями. Представленные в работе выводы достаточно обоснованы и могут быть использованы в практической деятельности.

Дипломная работа Сунгатуллиной Г.Э. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к дипломным работам, и может быть допущена к защите.

Старший научный сотрудник
Лаборатории прикладной микробиологии
Уфимского Института биологии РАН,
к.б.н.

Т.Р. Ясаков



Подпись: *Ясаков*
Заведующий:
Инспектор по кадрам: *Гомисев*

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 загрузки: 24.06.2017 09:32:55

Автор: Кобзева Наталья Рудольфовна nrkob@mail.ru / ID: 5Проверяющий: Кобзева Наталья Рудольфовна nrkob@mail.ru / ID: 5

Организация: Башкирский государственный медицинский университет

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

№ документа: 1898

Имя исходного файла: Антиплагиат

Сунгатулина Г.Э.

Размер текста: 3214 кБ

Символов в тексте: 113721

Слов в тексте: 13360

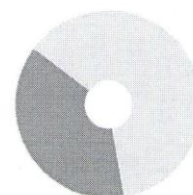
Число предложений: 1212

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Отчет от 24.06.2017 09:32:59 - Последний готовый отчет (ред.)

Комментарии: не указано

Модули поиска:

ЗАИМСТВОВАНИЯ
38.41%ЦИТИРОВАНИЯ
0%ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
61.59%

№	Заимств.	Источник	Ссылка	Загрузка	Модуль поиска
[01]	5.81%	Загрузить (4/6)	http://medpressa.kuzdrav.ru	08 Окт 2016	Модуль поиска Интернет
[02]	5.81%	Загрузить	http://medpressa.kuzdrav.ru	28 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет
[03]	5.24%	«Молекулярно-биологическая характеристика и совершенствование иденти..	http://microbe.ru	11 Дек 2016	Модуль поиска Интернет
[04]	3.81%	ПЦР-диагностика	http://knowledge.allbest.ru	раньше 2011	Модуль поиска Интернет
[05]	2.43%	ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВЫХ ШТАММОВ РОДА LACTOBACIL...	http://cyberleninka.ru	01 Дек 2014	Модуль поиска Интернет
[06]	2.27%	Точилина, Анна Георгиевна диссертация ... кандидата биологических наук : 0...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[07]	1.85%	не указано	http://mma.ru	07 Мая 2009	Модуль поиска Интернет
[08]	1.82%	Реферат микробиология	http://studfiles.ru	26 Июл 2016	Модуль поиска Интернет
[09]	1.52%	Бифиформ (Bifiform) - инструкция по применению, описание, отзывы, показа...	http://medicinform.net	раньше 2011	Модуль поиска Интернет
[10]	1.38%	Скачать диссертацию	http://gabrigh.ru	21 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет
[11]	1.34%	Полный текст диссертации	http://sdna.msu.ru	26 Дек 2016	Модуль поиска Интернет
[12]	1.21%	Исследования иммунобиохимической лаборатории ГНУ СИБНИИЖ	http://knowledge.allbest.ru	раньше 2011	Модуль поиска Интернет
[13]	1.19%	Эрвольдер, Наталья Юрьевна диссертация ... кандидата технических наук : 0...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[14]	1.1%	МЕТОДЫ ИФА ИЛИ ELISA (от англ. enzyme-linked.bxt	не указано	26 Мая 2016	Кольцо вузов
[15]	1.1%	МЕТОДЫ ИФА ИЛИ ELISA (от англ. enzyme-linked.txt	не указано	26 Мая 2016	Кольцо вузов
[16]	1.1%	МЕТОДЫ ИФА ИЛИ ELISA (от англ. enzyme-linked.txt	не указано	27 Мая 2016	Кольцо вузов
[17]	1.09%	Принципы ПЦР-диагностики. Реферат. Читать текст online -	http://bibliofond.ru	14 Июн 2014	Модуль поиска Интернет
[18]	0.99%	Методы культивирования облигатных внутриклеточных бактерий (риккетси...	http://megaobuchalka.ru	23 Мар 2016	Модуль поиска Интернет
[19]	0.98%	Цыденова, Цырема Батуевна диссертация ... кандидата медицинских наук : 14...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[20]	0.96%	Колонии по методу Дригальского	http://lektsii.org	07 Апр 2017	Модуль поиска Интернет
[21]	0.95%	60033	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[22]	0.91%	Лабораторная диагностика болезней животных	не указано	25 Апр 2013	Кольцо вузов
[23]	0.82%	Современные проблемы биохимии. Методы исследований. Учебное пособие	http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"
[24]	0.82%	235695	http://biblioclub.ru	19 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"
[25]	0.82%	Современные проблемы биохимии. Методы исследований	http://ibooks.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"

[26]	0.82%	65522	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[27]	0.77%	Беспоместных, Константин Владимирович диссертация ... кандидата техниче...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[28]	0.76%	http://www.volgmed.ru/uploads/files/2016-10/61616-zanyatie_41.doc	http://volgmed.ru	20 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет
[29]	0.75%	"БИОЛОГИЯ НАУКА XXI ВЕКА" (29/53)	http://birosinfo.ru	18 Окт 2014	Модуль поиска Интернет
[30]	0.72%	Садовая, Татьяна Николаевна диссертация ... кандидата технических наук : 05...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[31]	0.71%	Журнал «Трансляционная медицина» №3 (26) Июнь	http://almazovcentre.ru	12 Дек 2016	Модуль поиска Интернет
[32]	0.69%	59604	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[33]	0.67%	Молекулярные диагностические анализы обычно являются полуколичестве...	http://kk.docdat.com	14 Ноя 2015	Модуль поиска Интернет
[4]	0.64%	ОБЩАЯ ФИТОПАТОЛОГИЯ. Учебное пособие для академического бакалаври...	не указано	22 Фев 2017	Модуль поиска ЭБС "Юрайт"
[35]	0.64%	Алешкин, Андрей Владимирович диссертация ... доктора биологических наук...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[36]	0.62%	Соловьева, Ирина Владленовна диссертация ... доктора биологических наук ...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[37]	0.62%	Короткая, Елена Валерьевна диссертация ... доктора технических наук : 05.18...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[38]	0.62%	Пиксасова, Ольга Владимировна диссертация ... кандидата биологических на...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[39]	0.61%	ФЗС/Azizovam_n_ecl_2014_текстовая_часть_без_списка_литературы.txt	не указано	15 Дек 2014	Кольцо вузов
[40]	0.58%	Вершинина, Зия Рифовна диссертация ... кандидата биологических наук : 03...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[41]	0.54%	Богданова, Ольга Юрьевна диссертация ... кандидата биологических наук : 0...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[42]	0.5%	«СИГНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ РАСТЕН...	http://nbg.anrb.ru	24 Дек 2014	Модуль поиска Интернет
[43]	0.49%	ПрипутневичТВ	не указано	20 Июн 2014	Кольцо вузов
[44]	0.47%	Гейно Ксения Евгеньевна Diplom_Geyno исправленный.doc	не указано	04 Июн 2017	Кольцо вузов
[45]	0.47%	Сравнительный анализ качества мороженого пломбир различных товарных...	не указано	16 Июн 2016	Кольцо вузов
[46]	0.44%	253920	http://biblioclub.ru	19 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"
[47]	0.44%	60166	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[48]	0.43%	ПЦР в реальном времени	http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"
[49]	0.43%	216405	http://biblioclub.ru	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"
[50]	0.43%	ПЦР в реальном времени —6-е изд. (эл.)	http://books.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"
[51]	0.43%	42449	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[52]	0.43%	Благодастских, Екатерина Григорьевна диссертация ... кандидата биологическ...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[53]	0.43%	Известия ПГПУ им. В.Г. Белинского	http://books.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"
[54]	0.41%	Припутневич2	не указано	28 Ноя 2014	Кольцо вузов
[55]	0.4%	ref_Nemchenko.rar (3/6)	http://nzmedek.ru	30 Янв 2015	Модуль поиска Интернет
[56]	0.39%	Щуцкая Татьяна Александровна курсовая_3_.docx	не указано	02 Мая 2017	Кольцо вузов
[7]	0.38%	60167	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[58]	0.38%	Баскир А.Л. курсовая, 3 курс 53rp	не указано	02 Мая 2017	Кольцо вузов
[59]	0.37%	Нарыжный.doc	не указано	23 Янв 2015	Кольцо вузов
[60]	0.35%	Хангажинов, Александр Альбертович диссертация ... кандидата ветеринарных...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[61]	0.33%	Козлов, Антон Викторович диссертация ... кандидата технических наук : 05.18...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[62]	0.31%	Буш.doc	не указано	23 Янв 2015	Кольцо вузов
[63]	0.31%	НИРС (Трапезникова Буш) ант.docx	не указано	08 Окт 2015	Кольцо вузов
[64]	0.29%	Шибина, Лариса Викторовна диссертация ... кандидата медицинских наук : 14...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[65]	0.29%	Степаненко, Петр Петрович Учебник для студентов ВУЗов : диссертация ... до...	http://dlib.rsl.ru	26 Дек 2011	Коллекция диссертаций РГБ

[66]	0.26%	Производственный микробиологический контроль на предприятиях молоч...	http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"
[67]	0.26%	Производственный микробиологический контроль на предприятиях молоч...	http://books.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"
[68]	0.26%	71655	http://e.lanbook.com	10 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[69]	0.26%	Мелкумян, Алина Рантиковна диссертация ... кандидата медицинских наук : 0...	http://olbib.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[70]	0.25%	Тихонова, Дина Валерьевна диссертация ... кандидата медицинских наук : 03...	http://olbib.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[71]	0.25%	Физические методы исследования и их практическое применение в химичес...	http://books.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"
[72]	0.23%	Чамаева Т.И.	не указано	14 Июнь 2016	Кольцо вузов
[73]	0.21%	Похилюк Анастасия Геннадьевна Похилюк 04.05.2017.doc	не указано	05 Мая 2017	Кольцо вузов
[74]	0.2%	Копрологические исследования толстого кишечника на фоне бластоцистной.	http://bibliorossica.com	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"
[75]	0.2%	Копрологические исследования толстого кишечника на фоне бластоцистной.	http://books.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"
[76]	0.19%	64914	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[77]	0.18%	Современные аспекты выращивания поросят раннего возраста	http://books.ru	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"
[78]	0.16%	115080	http://biblioclub.ru	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"
[79]	0.15%	157874	http://e.lanbook.com	10 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[80]	0.14%	Павелко В.И. Диссертация	не указано	06 Апр 2016	Кольцо вузов
[81]	0.12%	Саватеева М.В.	не указано	14 Июнь 2016	Кольцо вузов
[82]	0.1%	64323	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[83]	0.09%	Червинец, Юлия Вячеславовна диссертация ... доктора медицинских наук : 03...	http://olbib.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[84]	0.08%	Фомина, Татьяна Алексеевна диссертация ... кандидата технических наук : 05...	http://olbib.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[85]	0.08%	1547	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[86]	0.08%	Фундаментальные науки - медицине : материалы Междунар. науч. конф. (Ми...	http://books.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"
[87]	0.07%	ДиссерЛ	не указано	08 Фев 2013	Модуль поиска "БГМУ"
[88]	0.06%	60118	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[89]	0.06%	Дисс Баженовой ЕА.doc	не указано	08 Окт 2013	Кольцо вузов
[90]	0.05%	259230	http://e.lanbook.com	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[91]	0.05%	Тетерина ТА	не указано	09 Авг 2014	Кольцо вузов
[92]	0.04%	228675	http://biblioclub.ru	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"
[93]	0.04%	58164	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"

24.06.2017г

