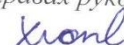


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

На правах рукописи



Хлопова Ксения Валерьевна

СЕЛЕКЦИЯ АУТОШТАММОВ *LACTOBACILLU SSPP.* С  
ВЫРАЖЕННОЙ АНТОГЕНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ  
ИСПОЛЬЗОВАНИИ БАКТЕРИОФАГОВ

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
профессор



Т. В. Маркушева

Уфа-2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	7
1.1. <i>Lactobacillus</i> .....	7
1.2. Пробиотики.....	12
1.3. Бактериофаги.....	15
1.4. Аутокультуры.....	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	22
2.1. Взятие материала.....	22
2.2. Приготовление питательной среды.....	23
2.3. Посев бактерий в жидкую питательную среду.....	25
2.4. Приготовление разведений для определения исходной концентрации в клиническом материале.....	25
2.5. Создание анаэробных условий.....	26
2.6. Окраска по Граму.....	27
2.7. Метод перпендикулярных штрихов.....	29
2.8. Титрование фага методом агаровых слоев.....	30
2.8.1. Метод титрования бактериофага по Аппельману (на жидкой питательной среде).....	30
2.8.2. Метод титрования бактериофага по Грация (на плотной питательной среде).....	30
2.9. Выделение ДНК.....	31
2.10. ПЦР в режиме реального времени.....	33
2.11. Ранговая статистика.....	35
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ...37	
3.1. Титрование бактериофага.....	37
3.2. Анализ устойчивости чистой культуры <i>Lactobacillus spp.</i> к действию Пиобактериофага в жидкой питательной среде.....	40
3.3. Анализ устойчивости чистой культуры <i>Lactobacillus spp.</i> к действию Пиобактериофага на плотной питательной среде.....	43

3.4. Определение исходной концентрации <i>Lactobacillus spp.</i> в клиническом материале.....	45
3.5. Получение накопительных культур.....	47
3.6. Сравнение конечной концентрации <i>Lactobacillus spp.</i> в образцах с и без Пиобактериофаг.....	48
3.7. Анализ активности Пиобактериофага по отношению к штаммам <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus faecium</i> ....	56
3.8. Выделение чистой культуры бактерий <i>Lactobacillus spp.</i> из накопительных культур.....	60
3.9. Идентификация исследуемых образцов до рода.....	63
3.10. Оценка антагонистической активности.....	72
3.11. Идентификация исследуемых образцов до вида.....	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	85
ВЫВОДЫ.....	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	89
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	96

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

БАВ – биологически активные вещества

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

РНК – рибонуклеиновая кислота

УПМ – условно-патогенный микроорганизм

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

MS – Mass Spectrometry

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

В современной бактериологической лаборатории исследование трудно культивируемых микроорганизмов по-прежнему остается одной из наиболее актуальных проблем.

Представители рода *Lactobacillus* являются облигатными анаэробами, имеющие сложные пищевые потребности в аминокислотах, витаминах, пептидах, индивидуальные для каждого вида, что усложняет задачу их культивирования на простых питательных средах [Воробьева А.А. и др., 2006].

Другой задачей является идентификация бактерий, полученных из клинического материала и выращенных на питательных средах. До недавнего времени подтверждение видовой принадлежности *Lactobacillus* осуществлялась на основе изучения морфологических, физиологических и биохимических признаков, что не всегда эффективно, особенно при работе со смешанными культурами [Кузнецова Т.В. и др., 2016].

На сегодняшний день одним из наиболее точных методов идентификации штаммов *Lactobacillus* является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) [Кузнецова Т.В. и др., 2016]. Но он не дает возможности получения чистых культур микроорганизмов, а только несет в себе информацию о качестве и количестве микробного агента.

В наши дни применение бактериофагов стало парадигмой лечебного и профилактического направления в медицине при терапии гнойно-воспалительных заболеваний различной локализации у детей и взрослых [Бондаренко В.М., 2005]. Диапазон способов применения бактериофагов необычайно широк, а использование их в качестве селективных агентов в клинической практике позволит значительно расширить его.

### **Цель исследования**

Селекция аутоштаммов *Lactobacillus spp.* с выраженной антагонистической активностью при использовании бактериофагов для разработки новых методик посева клинического материала на питательные среды, позволяющих значительно сократить продолжительность исследования в бактериологических лабораториях.

### **Задачи исследования**

1. Воздействие на культуры штаммов представителей рода *Lactobacillus* бактериофагом.
2. Бактериологическая характеристика полученных культур рода *Lactobacillus* и определение их антагонистической активности.
3. Применение методики ускоренного получения чистых культур представителей рода *Lactobacillus* с последующим созданием коллекции кандидатов в пробиотики.

### **Научная новизна**

Предложена селекция аутоштаммов *Lactobacillus spp.* с выраженной антагонистической активностью при использовании бактериофагов. Персонализация лечения больших групп населения при помощи модернизации аутоштамма нормофлоры *Lactobacillus spp.* является новейшим направлением безинвазивной медицины.

### **Практическая значимость**

Разработка новых способов культивирования *Lactobacillus spp.* позволит сократить время и затраты на преданалитическом этапе исследований в бактериологической лаборатории. Использование бактериофагов в качестве селективного агента значительно ускоряет процесс отбора кандидатов для будущих пробиотиков.

## ГЛАВА1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. *Lactobacillus*

Род *Lactobacillus* входит в семейство *Lactobacillaceae*, порядок *Lactobacillales*, класс *Bacilli*, тип *Firmicutes*, <группу без ранга> *Terrabacteria group*, царство Бактерии. По современной систематике в род лактобациллы входят:

- группа *Lactobacillus casei group*, в которую включены виды: *L. casei*, *L. paracasei*, *L. zeae*;
- большое число других видов: *L. acetotolerans*, *L. acidifarinae*, *L. acidipiscis*, *L. acidophilus*, *L. agilis*, *L. algidus*, *L. alimentarius*, *L. alvei*, *L. alvi*, *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylophilus*, *L. amylophilus*, *L. amylophilus*, *L. animalis*, *L. animata*, *L. antri*, *L. apinorum*, *L. apis*, *L. apodermi*, *L. aquaticus*, *L. aviarius*, *L. backii*, *L. bifermentans*, *L. bombi*, *L. bombicola*, *L. brantae*, *L. brevis*, *L. brevisimilis*, *L. buchneri*, *L. cacaonum*, *L. camelliae*, *L. capillatus*, *L. cateniformis*, *L. caviae*, *L. cerevisiae*, *L. ceti*, *L. coleohominis*, *L. colini*, *L. collinoides*, *L. composti*, *L. concavus*, *L. coryniformis*, *L. crispatus*, *L. crustorum*, *L. curieae*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. dextrinicus*, *L. diolivorans*, *L. equi*, *L. equicursoris*, *L. equigenersi*, *L. fabifermentans*, *L. faecis*, *L. faeni*, *L. farciminis*, *L. farraginis*, *L. fermentum*, *L. floricola*, *L. florum*, *L. formosensis*, *L. fornicalis*, *L. fructivorans*, *L. frumenti*, *L. fuchuensis*, *L. furfuricola*, *L. futsaii*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. gastricus*, *L. ghanensis*, *L. gigeriorum*, *L. ginsenosidimutans*, *L. gorillae*, *L. graminis*, *L. guizhouensis*, *L. halophilus*, *L. hammesii*, *L. hamsteri*, *L. harbinensis*, *L. hayakitensis*, *L. heilongjiangensis*, *L. helsingborgensis*, *L. helveticus*, *L. herbarum*, *L. heterohiochii*, *L. hilgardii*, *L. hokkaidonensis*, *L. hominis*, *L. homohiochii*, *L. hordei*, *L. iatae*, *L. iners*, *L. ingluviei*, *L. insectis*, *L. insicii*, *L. intermedius*, *L. intestinalis*, *L. iwatensis*, *L. ixorae*, *L. japonicus*, *L. jensenii*, *L. johnsonii*, *L. kalixensis*, *L. kefiranoferiens*, *L. kefir*, *L. kimbladii*, *L. kimchicus*, *L. kimchiensis*, *L. kisonensis*, *L. kitasatonis*, *L. koreensis*, *L.*

*kullabergensis*, *L. kunkei*, *L. larvae*, *L. leichmannii*, *L. letivazi*, *L. lindneri*, *L. malefermentans*, *L. mali*, *L. manihotivorans*, *L. mellifer*, *L. mellis*, *L. melliventris*, *L. micheneri*, *L. mindensis*, *L. mixtipabuli*, *L. mobilis*, *L. modestisalitolans*, *L. mucosae*, *L. mudanjiangensis*, *L. murinus*, *L. nagelii*, *L. namurensis*, *L. nantensis*, *L. nasuensis*, *L. nenjiangensis*, *L. nodensis*, *L. odoratitofui*, *L. oeni*, *L. oligofermentans*, *L. oris*, *L. oryzae*, *L. otakiensis*, *L. ozensis*, *L. panis*, *L. pantheris*, *L. parabrevis*, *L. parabuchneri*, *L. paracollinoides*, *L. parafarraginis*, *L. parakefiri*, *L. paralimentarius*, *L. paraplantarum*, *L. pasteurii*, *L. paucivorans*, *L. pentosiphilus*, *L. pentosus*, *L. perolens*, *L. plajomi*, *L. plantarum*, *L. pobuzihii*, *L. pontis*, *L. porcinae*, *L. psittaci*, *L. rapi*, *L. rennanquilly*, *L. rennini*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. rodentium*, *L. rogosae*, *L. rossiae*, *L. ruminis*, *L. saerimneri*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *L. sanfranciscensis*, *L. saniviri*, *L. satsumensis*, *L. secaliphilus*, *L. selangorensis*, *L. senioris*, *L. senmaizukei*, *L. sharpeae*, *L. shenzhenensis*, *L. sicerae*, *L. silagei*, *L. silagicola*, *L. siliginis*, *L. similis*, *L. songhuajiangensis*, *L. spicheri*, *L. sucicola*, *L. suebicus*, *L. sunkii*, *L. taiwanensis*, *L. thailandensis*, *L. timonensis*, *L. tuceti*, *L. ultunensis*, *L. uvarum*, *L. vaccinostercus*, *L. vaginalis*, *L. vermiforme*, *L. versmoldensis*, *L. vespulae*, *L. vini*, *L. wasatchensis*, *L. xiangfangensis*, *L. yonginensis*, *L. zymae*.

В составе некоторых видов лактобацилл выделены подвиды:

- *L. aviarius*:
  - *Lactobacillus aviarius* subsp. *araffinosus*
  - *Lactobacillus aviarius* subsp. *aviarius*
- *L. brevis*:
  - *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans*
  - *Lactobacillus brevis* subsp. *gravesensis*
- *L. coryniformis*:
  - *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis*
  - *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*
- *L. delbrueckii*:
  - *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*



- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus*
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *jakobsenii*
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii*
- *L. helveticus*:
  - *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*
- *L. kefiranofaciens*:
  - *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*
  - *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*
- *L. plantarum*:
  - *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis*
  - *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*
- *L. sakei*:
  - *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus*
  - *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei*

*Lactobacillus* – это палочковидные бактерии, с различной вариацией форм от вытянутых палочек до коккобацил, выстраивающиеся в короткие цепи, особенно в логарифмической фазе роста. Большинство неподвижны. Подвижные – по расположению жгутиков перетрихии. Спорообразования отсутствует. Окраса по Грамму положительная, при этом у некоторых культур выявляют биполярные тела. При переходе рН в щелочную среду становятся грамотрицательными.

У некоторых штаммов типового вид – *Lactobacillus delbrueckii*, биполярные тельца хорошо просматриваются при окрасе по Грамму или метиленовым синим также видно цитоплазматическую зернистость и исчерченность.

Культуральные свойства. Большинство облигатные анаэробы, некоторые штаммы аэротолерантны, капнофилы. Крайне избирательны в

пищевых потребностях, а именно аминокислотах, витаминах, пептидах, жирных кислотах, углеводах, нуклеиновых кислотах, отметим, что они для каждого вида.

Температурный оптимум культивирования 30-40°C, однако способны расти в широком диапазоне температур - от 5 до 53°C; оптимум pH-5,5-5,8. В анаэробных условиях при добавлении в питательную среду тиогликолята и цистеина будут культивироваться лучше. На чашах с кровяным агаром растут с образованием как крупные сероватых S-формы колоний, так и мелких колонии, окруженный зоной альфа-гемолиза.

Являются хемоорганотрофами с метаболизм бродильного типа. Каталазу и цитохромоксидазу не ферментируют. Сбраживают сахар. При расщеплении глюкозы pH снижается на одну единицу и более, лактат составляет не менее половины конечных продуктов ферментации. Не способны восстановить нитраты, не разжижают желатину, не расщепляют казеин, индол, и H<sub>2</sub>S не образуют. Разделяются на, факультативно-гетероферментативные и строго гомоферментативные. Облигатные одноферментативные *Lactobacillus spp.* ферментируют глюкозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, сорбит с образованием большого количества молочной кислоты (85%). Облигатные гетероферментативные *Lactobacillus spp.* ферментируют глюкозу, арабинозу, ксилозу, рамнозу с образованием малого количества молочной кислоты (50%). Факультативно-гетероферментативные лактобациллы занимают промежуточное положение между этими двумя лассами: они ферментируют пентозы (арабинозу, ксилозу и др.); гексозы (глюкоза, фруктоза, мальтоза и др.) сбраживают с образованием молочной кислоты; при дефиците глюкозы расщепляют ее до уксусной кислоты и спирта. За редким исключением не проявляют патогенных свойств.

Среда обитания. Считаются представителями нормофлоры ротовой полости, ЖКТ и влагалища человека. В ротовой полости встречаются *L.*

*casi*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. brevis* и *L. buchneri*; в толстом кишечнике они содержатся виды: *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. brevis*. У женщин детородного возраста являются доминирующей микрофлорой влагалища: *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. bevis* и *L. cellobiosis* [Воробьев А.А. и др., 2006].

Бактериоцины – особые антимикробные пептиды, секретируемые *Lactobacillus spp.* Свойства этих пептидов и протеинов имеет широкое разнообразие. Основные отличия внутри семейства бактериоцинов заключается в различии размеров, микробных мишенях, механизмах действия и воздействия на иммунитет [Блинкова Л.П. 2003]. Бактериоцины *Lactobacillus spp.* направленно действуют на бактерии занимающих одинаковую с ними экологическую нишу. Обычно проявляют свою активность по отношению к близкородственным бактериям [Бондаренко В.М. 2007].

Существуют несколько способов губительного воздействия бактериоцинов на клетку мишень, а именно один из способов связан с увеличением проницаемости мембраны у чувствительных бактерий. В которых благодаря рассеиванию сил формируются прерывистые поры, протоны приходят в движение, в результате этого теряется энергия и клетка гибнет [Woodman С.В. 2001]. Второй способ заключается в причинении вреда чувствительным бактериям пользуясь основной ферментной активности. Благодаря пептидному феромону для *quorum sensing* продукция бактериоцинов контролируется и зависит это от плотности популяции. В то время, когда конкуренция за питательные вещества становится наиболее сильной, микроорганизм запускать продукцию бактериоцинов [Woodman С.В. 2001]. Продукция бактериоцинов зависит от энергообеспеченности, температуры, уровня рН, источника азота и от окружающих условий [Chen С.С. 2005; Petrof Е.О. 2004]. Одним из основных механизмов защиты

лактобацилл в вагинальной экосистеме является продукция перекиси водорода [Zamfir M., 2000]. Генетическая основа продукции перекиси водорода пока не ясна, но ее способность подавлять гонококки уже доказана.

## 1.2. Пробиотики

По определению ВОЗ, пробиотик – это живые микроорганизмы, которые при примененные в адекватных количествах, способные оказывать оздоровительный эффект на макроорганизм. Впервые термин «пробиотик» был предложен Вергио, он в своей монографии «Anti- und Probiotika» описал основные позитивные и негативные эффекты для микробиоты кишечника от действия этих агентов [Шендеров и др., 2005; Маевская, 2010].

Пребиотики – это препараты немикробного происхождения, способные оказывать эффект на макроорганизм через селективную стимуляцию роста, а также усиления метаболической активности нормальной микрофлоры кишечника [Дармов И.В. и др., 2013; Дворников В.М. 2005.; Демаков В.А., 2008; Мечников И.И. и др., 1988].

Синбиотики – это препараты, микробного и немикробного происхождения при рациональной комбинации которых получают биологически активные добавки, входящие в состав функционального питания, обогащенные одним или несколькими штаммами представителей родов *Lactobacillus* и/или *Bifidobacterium* [Пиксасова О.В., 2009].

Классификация категории пробиотиков:

Монопробиотики – препарат представители только одного вида бактерий;

Ассоциированные пробиотики – препараты, представляющие собой ассоциацию штаммов нескольких видов микроорганизмов (от 2 до 30).

В зависимости от назначения пробиотиков их также разделяют на:

Гетеропробиотики – назначаются вне зависимости от видовой принадлежности хозяина, от которого первоначально были выделены штаммы пробиотических бактерий;

Гомопробиотики – назначаются только представителям того вида животных или человеку, из биоматериала которых были выделены соответствующие штаммы;

Аутопробиотики – штаммы нормальной микрофлоры, изолированные от конкретного индивидуума и предназначенные для коррекции его микроэкологии [Barrett E. и др., 2015].

Пробифор – лиофильно высушенная микробная масса живых бактерий антагонистически активного штамма, иммобилизованных на частицах косточкового активированного измельченного угля с добавлением лактозы.

На данный момент наиболее хорошо изученными пробиотическими штаммами являются бифидобактерии и лактобациллы.

Требования к пробиотическим производственным штаммам:

1. Предлагаемый штамм должен быть идентифицирован до вида и штамма по фено- и генотипическим признакам. Устойчивость штамма к антибиотикам обусловлена хромосомной природой.

2. Штамм должен обладать однородными морфологическими, тинкториальными, культуральными свойствами без признаков диссоциации.

3. Штамм должен быть однороден по физиолого-биохимическим свойствам, охарактеризованным с помощью регламентированных методов или с использованием лицензированных тест-систем.

4. Штамм не должен продуцировать ферменты, относящиеся к факторам патогенности.

5. Штамм должен обладать высокой антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным бактериям. Зона угнетения роста тест- культур на чашке Петри должна быть более 10 мм.

6. Штамм не должен обладать высокими адгезивными свойствами.

7. Штамм не должен быть чувствительным к воздействию желудочного сока, щелочи, желчи [Anderson K., и др. 2013.;Cleveland J и др. 2001].

Публикуются данные что в редких случаях, пробиотические штаммами *Lactobacillus spp.* у пациентов с ослабленным иммунитетом или тяжелыми хроническими заболеваниями подстегивают развитию инфекционного заболевания [Lin Y-G, 2004].

Некоторые пробиотики обладают способностью синтезировать высокоактивные антимикробные вещества. Особенно короткоцепочечные жирные кислоты (молочная, уксусная и пропионовая), угнетающие рост микроорганизмов, за счет понижения pH среды. Это неорганическое соединение – перекись водорода. Самыми высокоорганизованными антимикробными веществами, синтезируемыми *Lactobacillus spp.*, являются бактериоцины и бактериоциноподобные вещества. Доказанно, что бактериоцины устойчивы к высоким температурам, сохраняют активность в широком диапазоне pH. Данные вещества не имеют цвета и запаха.

Бактериоцин способен образовывать поры в мембранах даже при низких концентрациях. Недостатком является то, что данные соединения подвержены деструкции со стороны протеолитических ферментов. Бактериоцины рассматривают перспективной альтернативой антибиотикам [Cotter et al., 2013].

Жизнь пробиотиков в организме хозяина скоротечна, зачастую через неделю после прекращения курса их уже нельзя найти в материале пациента.

Причин тому масса, основная из них слабая адгезивная способность *Lactobacillus spp.* на эпителиальной стене. Но медицина не стоит на месте.

На сегодня самым эффективным способом доставки пробиотиков в ЖКТ с сохранением их жизнеспособности, является совместный прием суппозиторий бактерий с материнским молоком для грудничков. Даже на 60 день после прекращения приема препарата, бактерии были найдены в фекалиях. Более того они были доминантами микробиоты. Теоретическое обоснование этого процесса заключается в создание конгломерата бактерий с молекулами молочного сахара. На данный момент идут исследования по созданию таких искусственных структур для транспорта в нижележащие слои пищевого тракта для взрослых [Steven A. и др., 2017].

Фармакопейных препаратов или продуктов функционального питания содержащие в себе пробиотик являются достаточно эффективным лечебно-профилактическим средством. Но стоит заметить их эффективность в значительной степени ограничена тем, что используемые в их составе в качестве действующего начала штаммы микроорганизмов представителей нормальной микрофлоры являются чужеродными для макроорганизма. В результате происходит схожее явление как при трансплантации донорских тканей отторжение, т.е. вводимые в составе пробиотиков микроорганизмы не приживаются на слизистых кишечника и транзитом выводятся из организма.

Поэтому для получения положительного лечебного эффекта от применения бактериальных препаратов и продуктов функционального питания требуется длительный курс их применения (не менее 2 недель) и введение большого количества жизнеспособных клеток бактерий (не менее  $10^7$  КОЕ бактерий в 1 дозе) [Борисенко Е.Г., 2012].

### **1.3. Бактериофаги**

Бактериофа́ги или фа́ги (от греч. «пожираю») — вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Чаще всего бактериофаги размножаются внутри бактерий и вызывают их лизис. Как

правило, бактериофаг состоит из белковой оболочки и генетического материала одноцепочечной или двуцепочечной нуклеиновой кислоты (ДНК или, реже, РНК). Общая численность бактериофагов в природе примерно равна общей численности бактерий. Бактериофаги активно участвуют в круговороте химических веществ и энергии, оказывают заметное влияние на эволюцию микробов и бактерий [Сергей Г.2017].

Классификация вирусов бактерий основывается на характеристике хозяина вируса, в первую очередь учитываются серологические, морфологические свойства, а затем строение и физико-химический состав вириона [Ackermann H.W. 2003].

В настоящее время согласно Международной номенклатуре и классификации, бактериофаги разделяют, в зависимости от типа нуклеиновой кислоты на ДНК- и РНК- содержащие.

По морфологическим признакам ДНК-содержащие фаги выделены в следующие семейства: *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Lipothrixviridae*, *Plasmaviridae*, *Corticoviridae*, *Fuselloviridae*, *Tectiviridae*, *Microviridae*, *Inoviridae*, *Plectovirus* и *Inoviridae*, *Inovirus*.

РНК-содержащие выделены в *Cystoviridae* и *Leviviridae* [Ожерельева Н. Г., 1989].

По морфологическим признакам они подразделяются на 6 основных групп:

- 1) фаг с длинным отростком, чехол которого сокращается;
- 2) фаг с длинным отростком, чехол которого не сокращается;
- 3) фаг с короткими отростками;
- 4) фаг с аналогом отростка;
- 5) фаг без отростка;
- 6) нитевидный фаг.

Фаги обладают иммуногенностью, т.е. синтезируют типоспецифические антитела в организме.

По специфичности взаимодействия фаги разделяют на:



- поливалентные (лизируют близкородственные бактерии, например Эшерихии);
- моновалентные (лизируют бактерии только одного вида, например *E. coli*);
- типоспецифические (лизируют только определенные фаговары возбудителя, например *E. coli* №111).

Типы взаимодействия фагов с бактериями:

- 1) продуктивный тип – образуется фаговое потомство и в результате бактерии лизируются;
- 2) абортный тип – фаговое потомство не образуется и бактерии сохраняют свою жизнеспособность;
- 3) интегративный тип – геном фага встраивается в хромосому бактерии и сосуществует с ней, образуется фаговое потомство бактерия не лизируется.

В свою очередь в зависимости от типа взаимодействия с бактерией различают вирулентные и умеренные бактериофаги.

Вирулентные фаги развиваются по продуктивному типу.

Заражение бактерий вирионом возможно строго специфично, т.е. бактериофаги способны инфицировать только определенные виды и фаготипы бактерий.

Пути взаимодействия фагов и бактерий.

1. Адсорбция (взаимодействие строго специфических рецепторов).
2. Внедрение вирусной ДНК или РНК (инъекция фага) осуществляется за счет лизирования ферментами типа лизоцима в участке клеточной стенки, сокращения чехла, вталкивания стержня хвоста сквозь цитоплазматическую мембрану в цитоплазму, впрыскивание генетического материала.
3. Репродукция вируса.
4. Выход фагового потомства.

Умеренные фаги участвуют в обмене генетическим материалом между бактериями - в трансдукции. Например, способностью вырабатывать экзотоксин обладают только возбудитель дифтерии, в хромосому которого интегрирован умеренный профаг, несущий оперон *tox*, который и отвечающий за синтез дифтерийного экзотоксина.

Бактериофаги используют:

1) в клинической лабораторной диагностике инфекций при внутривидовой идентификации бактерий, т.е. определения фаговара. Широкое распространение получил метод фаготипирования.

2) лечение и профилактики бактериальных инфекций. Производят брюшнотифозный, сальмонеллезный, дизентерийный, синегнойный, стафилококковый, стрептококковый фаги; комбинированные: колипротейный, Пиобактериофаги. Бактериофаги имеют различные формы выпуска и правила употребления: перорально, парентерально или местно в виде жидких, таблетированных форм, свечей, аэрозолей.

3) нанабиотехнологии, бактериофаги широко применяют в генной инженерии, они служат векторами для получения рекомбинантных ДНК.

4) для мониторинга санитарного состояния окружающей среды и эпидемиологического анализа.

Преимущества бактериофаготерапии.

Считается наиболее безопасной заменой антибиотикотерапии в лечении бактериальных инфекций. Среди основных выделяют:

1) Они обладают намного меньшим количеством побочных эффектов, в сравнении с антибиотиками. Замечено, что на бактериофаги крайне редко отмечается аллергическая реакция, и гораздо реже происходит вторичные отрицательные эффекты в организме человека.

2) Сочетаются с совершенно любыми видами препаратов, в том числе и пенициллинового ряда, не вызывают привыкания. Все препараты имеют очень удобную для потребителя форму выпуска: растворы для приёма перорально или таблетки.

3) При продолжительном использовании фагов, не отмечается угнетения иммунной системы.

4) Излечивают даже неострые, вялотекущие воспалительные процессы и вирусы, при которых использовать антибиотики считается нецелесообразным.

5) В отличие от других медикаментов, к которым у большинства вирусов и микробов развивается постепенная резистентность, адаптироваться к фагам, вредным микроорганизмам практически невозможно.

Недостатки бактериофаготерапии:

1) Вероятность переноса генома рекомбинантных ДНК бактерии между микроорганизмами;

2) Сложности с подбором наиболее подходящей для лечения группой бактериофагов;

3) Общий курс терапии вируса занимает не менее 20 дней в то время, как лечение антибиотиками проходит всего 3–7 суток;

4) Использование фагов при лечении детских инфекционных заболеваний требует перед назначением прохождения бактериостатического и бактериологического анализ на состояние микрофлоры [GuliyO.I.2007].

Многие заголовкам научным статей, расхваливают существующие положительных сторон бактериофагов. Пророчат новую эру без антибиотиков. На смену которым придут бактериофаги - возможная панацея 21 века. Сложно не согласиться с этим контекстом, но в последнее время начинают проявляться и отрицательные стороны этих помощников. А именно. Помимо высокой лизирующей активности. Вирусы способны обучать бактерий сопротивлению факторам антогонизма, к тем же антибиотикам. В естественных резервуарах подобно библиотечному фонду вирионы хранят колоссальный запас «знаний» по созданию механизмов защиты для бактериальных инфекций. Не трудно представить, что после

массово начала использования бактериофагов как лекарственных средств, будет не менее массовый всплеск мутаций со стороны братьев окружающего нас микромира. И самая банальная, энтеропатогенная палочка сможет вписать свое имя в историю человеческих пандемий [M.Colomer-Lluch, и др., 2011].

#### 1.4. Аутокультуры

Аутопробиотики – штаммы нормальной микрофлоры, изолированные от конкретного индивидуума и предназначенные для коррекции его микроэкологии [Barrett E. и др., 2005].

Применение:

1) Наиболее прямой путь дифференцировки дисбактериоза и инфекции вызванных условно патогенными микробами – это аутосерологии. Широкое применение получили экспрессные методы микрореакций в аутосерологии.

Данные аутосерологические методы позволяют сравнительно легко обнаруживать антитела к аутокультурам в сыворотках крови пациентов при диареях. Время на постановку анализа всего 3-3,5 часа [Н.Н. Зинин-Бермес, и др. 2004].

2) Лечение аутоиммунных заболеваний, а также заболеваний, связанных с нарушением макро-мимбиотических связей.

Один из способов получения аутопробиотика, содержащего живые *Lactobacillus spp.* предназначенный для лечения нарушенной микроэкологии макроорганизма. *Lactobacillus spp.* выделяют одновременно в виде естественных комплексов кишечника человека и/или животных путем деконтаминации содержимого кишечника от посторонней микрофлоры. Полученная биомасса содержит *Lactobacillus spp.*, являющиеся истинными представителями индигенной микрофлоры

хозяина. Способ позволяет использовать в качестве аутопробиотика полученную биомассу для восстановления микрофлоры кишечника человека и ценных экземпляров животных и птиц [патент RU 2139070].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Взятие материала

Материал для исследования – отделяемое с заднего свода влагалища.

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

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

При взятии биоматериала для микробиологического исследования были соблюдены следующие требования:

- брать материал из очага инфекции, где возбудитель находится в максимальном количестве;
- брать материал до проведения мануального влагалищного исследования; удостовериться, что пациентка не использовала местного лечения по крайней мере в течение последних трех суток;

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

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

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

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

— использовать для взятия пробы стерильные одноразовые инструменты.

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

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

## **2.2. Приготовление питательной среды**

Жидкая питательная среда для выделения и культивирования *Lactobacillus spp.* Бульон MPC для лактобактерий (*Lactobacillus* MRS Broth), производство HiMedia.

Эта среда дается по прописи deMan, Rogosa и Sharpe с небольшой модификацией. На ней обильно растут лактобактерии из ротовой полости, молочных продуктов, других пищевых продуктов, фекалий и другого материала.

Бульон MPC представляет собой гомогенный сыпучий желтый порошок.

## Состав:

Ингредиенты.....	грамм/литр
Протеозопептон.....	10,00
Мясной экстракт.....	10,00
Дрожжевой экстракт.....	5,00
Глюкоза.....	20,00
Твин-80.....	1,00
Аммония цитрат.....	2,00
Натрия ацетат.....	5,00
Магния сульфат.....	0,10
Марганца сульфат.....	0,05
Натрия гидрофосфат.....	2,00

Протеозопептон и мясной экстракт являются источником необходимых питательных веществ, глюкоза – ферментируемым субстратом и источником энергии. Дрожжевой экстракт обеспечивает витаминами группы В. Твин-80 является источником жирных кислот, необходимых для роста лактобактерий. Ацетат натрия и цитрат аммония подавляют рост стрептококков, плесневых грибов и многих других микроорганизмов.

Полужидкая среда создает анаэробные условия, а совокупность компонентов, входящих в состав среды, обеспечивает питательные потребности для роста *Lactobacillus spp.*

Способ приготовления: Размешать 67,15 г порошка М641 или 55,15 г порошка М369 в 1000 мл дистиллированной воды. Прокипятить для полного растворения частиц. Разлить в пробирки или флаконы. Стерилизовать автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин. Конечное значение рН (при 25°C)  $6,5 \pm 0,2$



### **2.3. Посев бактерий в жидкую питательную среду**

В левую руку берут флакон с инокулятом, в асептических условиях стерильной пипеткой забирают 0,1 мл исследуемого материала. Затем в левую руку берут пробирку №1. Для того, чтобы можно было наблюдать за содержанием пробирки, держат сверху кисти руки. Пробку из пробирки вынимают, держа ее 4 и 5 пальцами правой руки. Тремя другими пальцами правой руки, как карандаш, держат пипетку, в которой исследуемый материал. Пробирку открывают и край проносят через пламя спиртовки. Материал, который набирали пипеткой, выливают в питательную среду, для равномерного распространения его пробирку осторожно, чтобы не замочить пробку, стряхивают или вращают, зажав в ладонях. Край пробирки и пробку проносят через пламя спиртовки и закрывают пробирку. Аналогичные действия проводят с оставшимися пятью пробирками. Посевы инкубируют в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 24 ч.

### **2.4. Приготовление разведений для определения исходной концентрации в клиническом материале**

Готовим десятикратные разведения клинического материала (рисунок 1). Разведения делают в пробирках (5 шт. на один клинический материал), содержащих по 4,5 мл жидкой селективной питательной среды. В первую пробирку вносят 0,1 г клинического материала и считают это разведение первым ( $10^{-1}$ ). Содержимое пробирки тщательно перемешивают, при помощи автоматического дозатора со съемными стерильными наконечниками с фильтром переносят 0,5 мл суспензии во вторую пробирку, получая при этом второе разведение ( $10^{-2}$ ). Таким же образом готовят и последующие разведения (до  $10^{-5}$ ).

Пробирки инкубируют в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 24 ч.

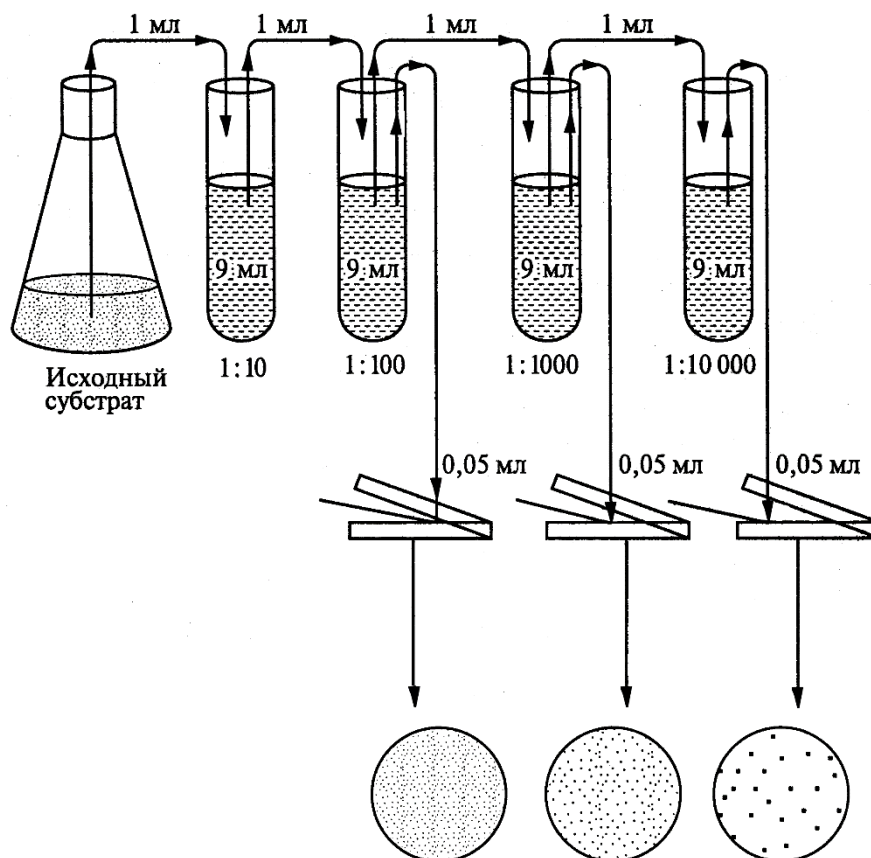


Рисунок 1 – Схема приготовления разведений и посева

## 2.5. Создание анаэробных условий

Эксикатор – это сосуд диаметром от 15 до 30 см (емкостью от 100 до 300 мл), в котором поддерживается определенный уровень влажности воздуха – около 0 %. Он состоит из емкости, изготовленной из толстого высококачественного боросиликатного или лабораторного стекла, реже из полимерных материалов с крышкой, внутри которого находится осушитель.

Благодаря специальным фарфоровым вкладышам внутрь посуды можно поставить тигель кварцевый, выпарные чашки, чашки Петри, бюксы и другие емкости. Нижняя часть данного изделия уже, чем верхняя. Такая конструкция позволяет устойчиво держаться вкладышу. Фарфоровый вкладыш имеет специальное отверстие, через которое обеспечивается циркуляция воздуха. При работе такую лабораторную посуду накрывают крышкой, также изготовленную из толстого стекла. С целью обеспечения герметичности шлиф эксикатора смазывают вязким смазочным материалом – вазелином.

Часто при работе с эксикатором возникает проблема с открытием крышки, так называемое разрежение. Это происходит в результате охлаждения теплого воздуха внутри посуды. В таких случаях крышку следует аккуратно сдвинуть в сторону.

Микроаэрофилы размножаются при пониженном парциальном давлении кислорода. Концентрация  $\text{CO}_2$  должна быть 1-5%. Для этого используют специальные  $\text{CO}_2$  –инкубаторы или посевы помещают в эксикаторы, в которых устанавливают горячую свечу.

## 2.6. 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 (Грамм-) 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. Окрашивание 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, Грамм(-), воспринимая дополнительную окраску, приобретают ярко-малиновый цвет.

## 2.7. Метод перпендикулярных штрихов

Согласно широко используемому в микробиологии методу перпендикулярных штрихов [Шендеров И.В., 2005], на поверхности агаровой среды в чашке Петри высевают штрихом экспоненциальную культуру исследуемого штамма и инкубируют при оптимальной для него температуре (30 и 37 °С соответственно для мезофильных и термофильных форм) в течение определенного времени (например, 24 или 48 ч) для образования и диффузии в агар ингибиторных соединений. Затем перпендикулярно от края чашки к штриху выросшей культуры подсевают штрихом экспоненциальную культуру тест-штамма (например, *E. coli*), слегка касаясь штриха. Чашку вновь инкубируют, но теперь при условиях (температура и продолжительность), благоприятных для роста тест-культуры. О наличии и степени антагонистической активности у испытуемой судят по величине зоны ингибирования тест-штамма на границе со штрихом роста. На одной чашке можно подсеять несколько тест-культур и, таким образом, выявить спектр антагонистического действия данной бактерии. Используемая агаровая среда должна обеспечивать хороший рост как испытуемого штамма.

Чашки можно инкубировать в аэробных условиях, либо (при необходимости) в анаэробе. Для исключения влияния молочной кислоты и pH на результаты тестирования, в агаровую среду вносят подходящие буферные соли. Аналогичным образом, влияние перекиси водорода снимают добавлением в среду каталазы. Так как размер зон ингибирования тест-культуры в значительной степени зависит от толщины слоя питательного агара, чашки Петри перед розливом среды располагают на строго горизонтальной поверхности и в каждую чашку наливают одинаковое количество расплавленной среды [Academa, 2005].

## **2.8. Титрование фага методом агаровых слоев**

### **2.8.1. Метод титрования бактериофага по Аппельману (на жидкой питательной среде)**

Готовят десятикратные разведения исследуемого бактериофага в питательном бульоне. Для этого в ряд пробирок разливают по 4,5 мл бульона. В 1-ю пробирку добавляют 0,5 мл исследуемого фага. Тщательно перемешивают и переносят в последующие пробирки (из пробирки в пробирку) по 0,5 мл соответствующего разведения фага с уменьшением его концентрации в десять раз. Получают разведения от  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$  степени. Затем в пробирки вносят по 1 капле суточной культуры соответствующих бактерий. После инкубации в течение суток определяют титр фага.

За титр бактериофага принимают то его максимальное разведение, при котором наблюдается полный лизис культуры (просветление среды).

### **2.8.2. Метод титрования бактериофага по Грациа (на плотной питательной среде)**

Питательный агар разливают в чашки Петри и подсушивают в термостате. Готовят полужидкий питательный агар по 3–4 мл в пробирке и растапливают его на водяной бане. Делают десятикратные разведения исследуемого бактериофага в изотоническом растворе хлорида натрия. Затем 0,5 мл каждого разведения бактериофага смешивают с таким же объёмом суточной бульонной культуры чувствительных к бактериофагу бактерий и выливают эту смесь в пробирку с полужидким агаром температурой  $45^{\circ}\text{C}$ .

Приготовленную смесь быстро выливают на поверхность первого слоя агара в чашке Петри, где она застывает в виде тонкого слоя. После застывания второго слоя агара чашки инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение суток.

Смеси бактериофага, культуры и полужидкого агара делают из разведений фага  $10^2$ – $10^{10}$ , в зависимости от предполагаемого титра фага.

Не заражённые бактериофагом бактерии, размножаясь, образуют сплошной газон роста на поверхности питательного агара. Каждая инфицированная бактериофагом бактерия лизируется и освобождает потомство бактериофага, которое внедряется в интактные клетки бактерий, и весь цикл повторяется. В результате лизиса клеток на сплошном бактериальном газоне появляются «стерильные» пятна или негативные колонии бактериофага. Число этих пятен соответствует количеству фаговых частиц в засеянной смеси. Количество пятнообразующих единиц в 1 мл исходной суспензии бактериофага называется его титром [Гудков Д.Р., 2003].

## 2.9. Выделение ДНК

Для выделения ДНК использовали набор реагентов «Лизирующий раствор (Р)» (Вектор-Бест). Набор представляет собой пробирки объемом 1,5 мл, содержащие по 0,5 мл лизирующего раствора (рисунок 2).

Способ позволяет получить препараты микробиальной ДНК высокой степени чистоты и нативности. ДНК микроорганизмов выделяют путем разрушения микробных клеток лизирующим раствором [Тихоненко Т.И., 1962].

Коротким центрифугированием собрать капли со стенок пробирок с транспортным раствором, содержащим аналитический материал.

Подготовить и расставить в штативе пробирки с лизирующим раствором.

В каждую пробирку одним наконечником внести по 100 мкл пробы (содержимое пробирки, берется нижняя часть пробирки). Рекомендуется использовать наконечники с аэрозольным фильтром. Если фильтр окрасится, необходимо поменять наконечник.



Рисунок 2 – Набор «Лизирующий раствор (P)» (Вектор-Бест)

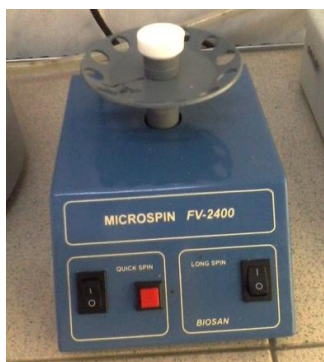


Рисунок 3 – Вортекс MicrospinFV-2400, BIOSAN.

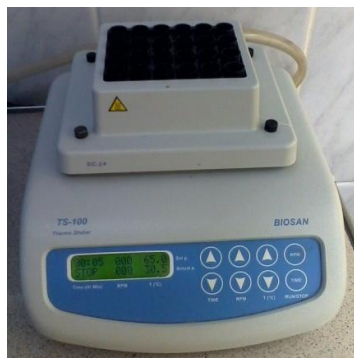


Рисунок 4 – Термостат для пробирок типа «эппендорф» от 25 до 1000°C  
TermoShakerTS-100, BIOSAN



Рисунок 5 – Микроцентрифуга для пробирок типа «эппендорф» до 16 тыс.  
об./мин CentrifugeCM-50



Пробирки плотно закрыть крышками, защелкнув замочек на крышках, ресуспензировать на Вортексе (рисунок 3).

Поместить пробирки в предварительно прогретый до 98°C термостат и прогреть при 98°C 15 минут (рисунок 4).

После прогрева пробирки необходимо охладить до температуры (18-25)°C, перенести в центрифугу и центрифугировать при 13 тысячах об/минуту (рисунок 5).

Пробы готовы к постановке реакции ПЦР. Полученные в результате центрифугирования супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки амплификации.

## **2.10. ПЦР в режиме реального времени**

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, деионизированную воду, кроме праймеров и зондов.

Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом в 25 мкл, содержащей 3 мкл исследуемого образца ДНК, 10 мкл 2.5× ПЦР-микс, по 1 мкл прямого и обратного праймера, 10 мкл ddH<sub>2</sub>O.

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.

На приборе создали эксперимент с соответствующими параметрами плашки: размер, тип, режим сканирования, флуорофор, названия проб;

указали объем реакционной смеси в одной пробирке. Затем запустили программу с параметрами (таблица 1).

Таблица 1 – 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

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

Правила создания и запуска программы амплификации на детектирующем амплификаторе CFX96 Touch «REAL TIME» (Bio-Rad, США)

1. Включаем источник питания прибора.
2. Нажимаем «Пуск», затем программное обеспечение «Bio-Rad CFX Manager»
3. Для того, чтобы открыть крышку прибора нажимаем «Файл», «Повторить эксперимент» и выбираем любую из представленных программ. Крышка открылась. Вкладку закрываем.
4. Устанавливаем пробирки в ячейки.
5. Нажимаем «Файл», «Создать эксперимент».
6. Нажимаем «Протокол», «Редактировать».
7. Устанавливаем температуру и время для первых трех режимов амплификации (например, 95°C for 5:00; 95°C for 0:10; 59°C for 0:25).
8. Нажимаем «Вставить шаг».

9. Устанавливаем температуру и время для следующего режима (например, 72°C for 0:30).
10. Нажимаем на кнопку «Удаление чтения плашки»
11. Устанавливаем количество циклов (например, 34).
12. Указываем объем пробы (например, 25 мкл). Нажимаем «ОК» и сохраняем изменения.
13. Нажимаем на вкладку «Плашка», «Редактировать».
14. Выделяем все ячейки и нажимаем «Очистить лунки».
15. Переключаем режим сканирования на «SYBR/FAM».
16. Нажимаем «Выбрать флуорофоры» и ставим галочку над «SYBR», нажимаем «ОК».
17. Нажимаем «Тип пробы», «Неизвестен».
18. Устанавливаем «Имя пробы»: выделяем ячейку, вводим имя пробы и нажимаем «Загрузить». Данные сохраняем.
19. Нажимаем «Закрыть крышку», «Начать прогон», «Сохранить».

## 2.11. Ранговая статистика

Ранговой статистикой называется любая статистика, которая является функцией от рангов элементов  $r_i$ , а не от их значений  $x_i$ . Переход от значений к их рангам позволяет строить непараметрические статистические тесты, которые не опираются на априорные предположения о функции распределения выборки. Они имеют гораздо более широкую область применения, чем параметрические статистические тесты.

Применение непараметрических критериев для оценки достоверности показателей исследований для несвязанных совокупностей.

Эти критерии особенно часто применяются в исследованиях, где имеются опытные и контрольные группы, где необходимо сравнить результаты двух групп наблюдений, относящихся к различным заболеваниям или стадиям болезни и т.д.

### Критерий Уайта.

Относится к непараметрическим критериям. Применяется в тех же случаях, что и критерий Q, но отличается большей статистической мощностью и позволяет эффективно использовать результаты измерений, полученных на выборках малого объема. По алгоритму действий похож на критерий Вилкоксона.

Значения переменной обеих выборок записывают в виде общего ранжированного ряда с указанием принадлежности к той или иной выборке. Каждому члену общего ряда присваивают порядковый номер - ранг. Одинаковым значениям  $X_i$  приписывается среднее арифметическое соответствующих рангов. Ранги суммируют отдельно по каждой из выборок. Меньшая сумма рангов обозначается как  $T_{\phi}$ . Как и при использовании критерия Вилкоксона для отклонения нулевой гипотезы необходимо чтобы фактическая величина была меньше табличной. Для иллюстрации применения критерия Уайта используем ту же задачу с определением уровня оперативной памяти. Ниже приводится общий ранжированный ряд  $X_i$  с соответствующими рангами R.

Последовательность расчета:

1. Данные рядов X и Y ранжируются от меньшей величины к большей вне зависимости от их принадлежности к тому или иному ряду.
2. Ранги суммируются отдельно для рядов X и Y.
3. Меньшая из сумм оценивается по таблице.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Титрование бактериофага

Для создания способа селекции аутоштамов *Lactobacillus spp.* с выраженной антогонистической активностью при использовании бактериофагов нами были проведен ряд исследований. Первым из них было определение титра препарата «Пиобактериофаг поливалентный очищенный» (ФГУП НПО «Микроген», Россия), включающего родоспецифические (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Proteus spp.*) и видоспецифические (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) бактериофаги. Эксперимент проводили методом агаровых слоев с использованием «Питательная среда для выделения энтеробактерий (агар Эндо – ГРМ)», производство: ФБУН государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск (рисунок 10).

После приготовления десятикратного разведения исходной суспензии бактериофага в стерильном физиологическом растворе. К каждой из 11 чашек Петри с агаром Эндо добавили стерильной пипеткой 0,1 мл ночной бульонной культуры *E. coli*, равномерно распределяя по поверхности среды. Только к 10 чашкам со средой и культурой добавили по 0,1 мл соответствующего разведения фаговой суспензии, равномерно распределив ее по поверхности агара. Одну чашку Петри со средой и культурой использовали в качестве контроля оставив ее без Пиобактериофага. После застывания чашки переворачивают вверх дном и поставили инкубироваться в термостат при 37°C на ночь.

На следующий день произвели подсчет количества негативных колоний на каждой чашке и определили титр фага в исходном препарате с учетом фактора разведения и объема вносимого материала (таблица 2, рисунок 17).

Образование каждого стерильного пятна было вызвано единственной частицей бактериофага. Например, если при нанесении на чашку 0,1 мл фаговой суспензии при разведении  $1 \times 10^7$  на этой чашке образовалось 150 стерильных пятен, то титр фаголизата был равен  $(150 \times 10) 10^7 = 1,5 \cdot 10^{10}$  частиц в 1 мл [Атабеков И.Г., 2002].



Рисунок 6 – Приготовление питательной среды.



Рисунок 7 – Ход работы.

Таблица 2 – Титрование фага методом агаровых слоев. Учет результатов

Разведение	Результаты
$10^0$	Негативные колонии
$10^{-1}$	Негативные колонии
$10^{-2}$	Негативные колонии
$10^{-3}$	Негативные колонии
$10^{-4}$	Негативные колонии
$10^{-5}$	Негативные колонии
$10^{-6}$	Негативные колонии
$10^{-7}$	Негативные колонии
$10^{-8}$	Негативные колонии
$10^{-9}$	Отсутствие негативных колоний, сплошной рост бактерий
$10^{-10}$	Отсутствие негативных колоний, сплошной рост бактерий
Контроль	Сплошной рост бактерий

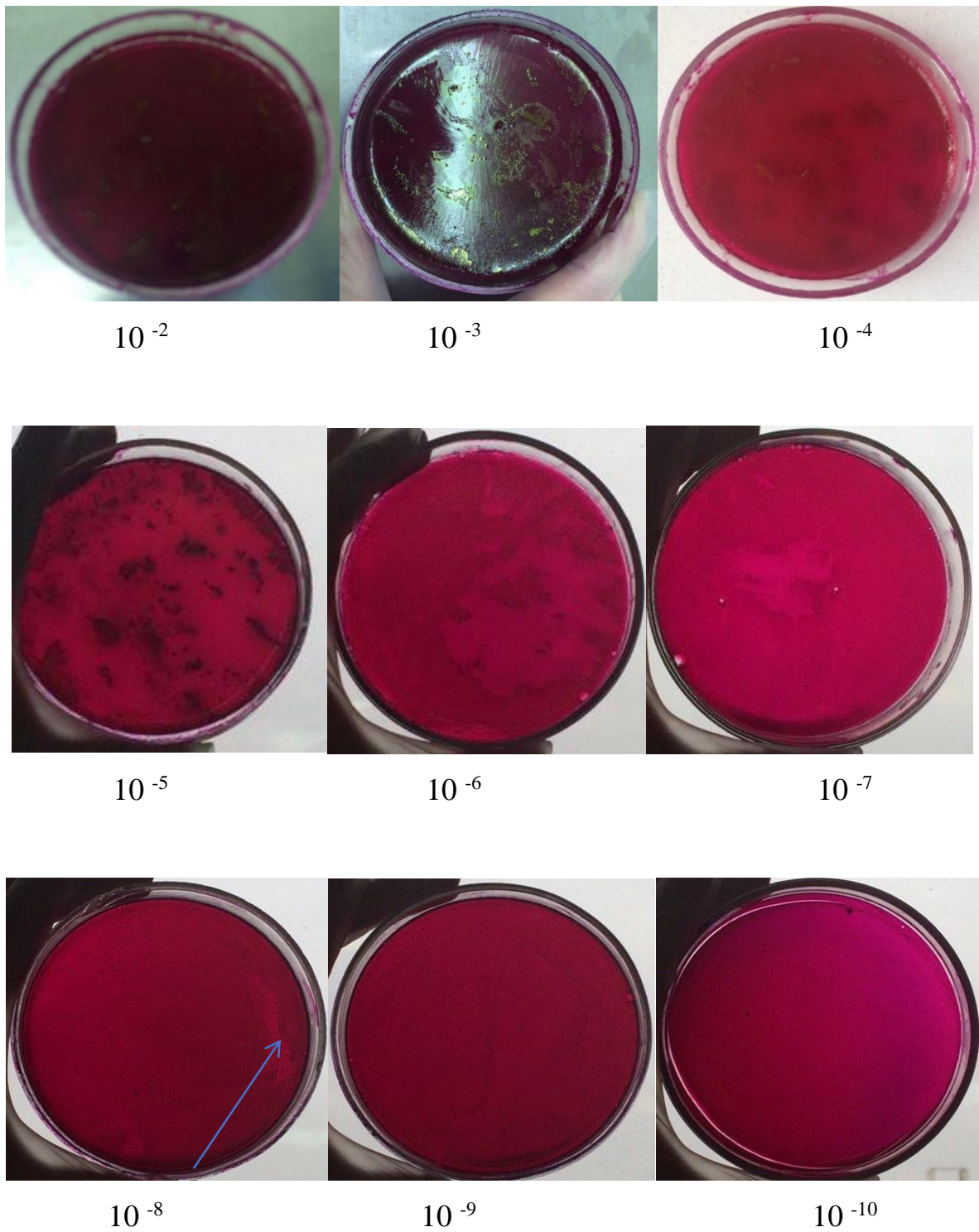


Рисунок 8 – Рост *E. coli* на агаре Эндо. Цифрами указаны разведения исходной суспензии Пиобактериофага. Стрелкой указана негативная колония

Таким образом, при разведении  $10^{-8}$  на этой чашке образовалось стерильное пятно, значит титр фаголизата равен  $(1 \times 10) 10^8 = 1 \cdot 10^9$  частиц в 1 мл. Нам удалось выяснить, что концентрация препарата «Пиобактериофаг поливалентный очищенный» (ФГУП НПО «Микроген», Россия) составляет  $10^9$  БОЕ/мл.

По литературным данным считается, что бактериальную суспензию заражают, внося суспензию фага с известным титром при множественности заражения 0,1 (отношение числа фаговых частиц к числу бактериальных клеток). При внесении небольшого количества фага в культуру чувствительных бактерий, активно размножающихся в жидкой питательной среде, частицы бактериофага адсорбируются на бактериальных клетках и после латентного периода лизируют их. Освободившееся в среду потомство частиц бактериофага заражает клетки, не вовлеченные в процесс инфекции, вызывая второй инфекционный цикл. Таким образом, последовательно заражаются все клетки суспензии, и процесс продолжается асинхронно до тех пор, пока не произойдет лизис всех чувствительных бактерий [И.Г. Атабеков, 2002].

Так как при дисбиотических процессах общая бактериальная масса в образце составляет  $10^{10}$  КОЕ/мл, то для сохранения множественности заражения 0,1 вносили суспензию фага с титром  $10^9$  БОЕ/мл.

Во всех исследованиях на 1,0 мл или 1,0 г клинического материала добавляли 1,0 мл исходной суспензии Пиобактериофага  $10^9$  БОЕ/мл без дополнительного разведения.

### **3.2. Анализ устойчивости чистой культуры *Lactobacillus spp.* к действию Пиобактериофага в жидкой питательной среде**

Для исследования возможного влияния бактериофагов на рост *Lactobacillus spp.* в качестве тестируемой чистой культуры использовали *Lactobacillus plantarum* из пробиотика Лактобактерин и препарат



«Пиобактериофаг поливалентный очищенный» (производство ФГУП НПО «Микроген», Россия).

Стерильную жидкую питательную среду для выделения и культивирования *Lactobacillus spp.* Бульон МРС для лактобактерий в асептических условиях разливали в подготовленные 6 пробирок по 10,0 мл. В первые три пробирки добавляли по 1,0 мл препарата «Пиобактериофаг поливалентный очищенный» (опыт), во вторые три пробирки – 1,0 мл дистиллированной воды (контроль).

Для получения культур исследуемых микроорганизмов были приготовлены инокуляты из лиофилизированных бактерий. Для этого были выбраны пробиотики, наиболее широко используемые для нормализации микрофлоры влагалища и кишечника, а именно Лактобактерин. Для приготовления суспензии содержимое флакона (лиофилизат) растворили кипяченой водой комнатной температуры из расчета 5 мл воды на 1 дозу препарата.

В левую руку взяли флакон с инокулятом, в асептических условиях стерильной пипеткой забирали 0,1 мл исследуемого материала. Затем в левую руку взяли пробирку №1. Для того, чтобы можно было наблюдать за содержанием пробирки, держали сверху кисти руки. Пробку из пробирки вынимали, держа ее 4 и 5 пальцами правой руки. Тремя другими пальцами правой руки, как карандаш, держали пипетку, в которой исследуемый материал. Пробирку открывали и край проносили через пламя спиртовки.

Материал, который набирали пипеткой, выливали в питательную среду, для равномерного распространения его пробирку осторожно, чтобы не замочить пробку, стряхивали или вращали, зажав в ладонях. Край пробирки и пробку проносили через пламя спиртовки и закрывали пробирку.

Аналогичные действия проводили с оставшимися пятью пробирками. Посевы инкубировали в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 24 ч.

После культивирования в течение 24-48 часов при  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  в анаэробных условиях в эксикаторе со свечой при повышенном содержании  $\text{CO}_2$  в жидкой питательной среде во всех пробирках наблюдали диффузное помутнение по всему объему среды и прозрачной зоной в верхней части, что характерно для *Lactobacillus spp.* (рисунок 10, таблица 3).

Таким образом, нам удалось выяснить, что в жидкой селективной питательной среде данный Пиобактериофаг не влияет на подавление роста *Lactobacillus spp.*



Рисунок 9 – Создание анаэробных условий. Эксикатор. Метод свечи.

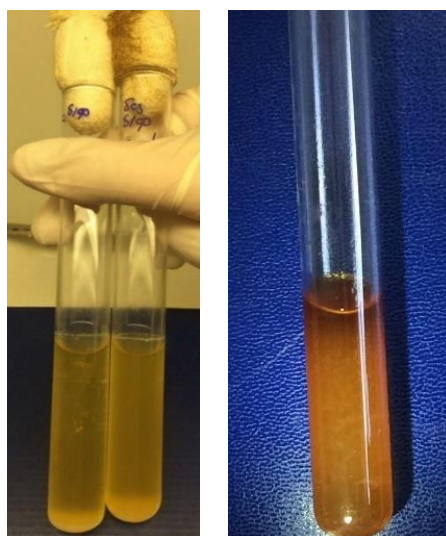


Рисунок 10 – Рост *Lactobacillus spp.* в жидкой питательной среде.

Таблица 3 – Рост *Lactobacillus spp.* в жидкой питательной среде

Испытуемая культура	<i>Lactobacillus spp.</i>
Питательные среды	
Жидкая питательная среда для выделения и культивирования лактобактерий	+ + +
-/- с добавлением Пиобактериофага	+ + +

Примечание: «+» - наличие роста бактерий.

### 3.3. Анализ устойчивости чистой культуры *Lactobacillus spp.* к действию Пиобактериофага на плотной питательной среде

Следующим этапом нашего эксперимента стало наблюдением за влиянием Пиобактериофага на свойства *Lactobacillus spp.* на плотной питательной среде.

На плотную неселективную питательную среду для культивирования микроорганизмов «ГРМ-агар» (производство ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии) в асептических условиях разлили в подготовленные 6 чашек Петри. В первые три чашки добавили по 1,0 мл препарата «Пиобактериофаг» (опыт), вторые три чашки оставили для контроля.

В левую руку взяли флакон с инокулятом, в асептических условиях стерильной пипеткой произвели забор 0,1 мл исследуемого материала. Использовали 3 чашки Петри с питательной средой. В одну из чашек на питательный агар пастеровской пипеткой нанесли каплю исследуемого материала и разнесли материал бактериологической петлей по всей поверхности агара. Затем бактериологическую петлю перенесли во 2-ю чашку и разнося оставшуюся культуру по поверхности питательной среды. Далее бактериологическую петлю перенесли в 3-ю чашку и аналогичным образом произвели посев, после чего чашки поместили в термостат.

Аналогичные действия провели с оставшимися чашками Петри. Посевы проинкубировали в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 24 ч.

После культивирования на питательной среде при 37±1°C в анаэробных условиях в эксикаторе со свечой при повышенном содержании CO<sub>2</sub> в течение 24-48 часов на всех чашках Петри наблюдали колонии плоские, полушаровидные, блестящие, шероховатые, окруженные валиком, имеющие более темный центр, от белого и серого до темно-коричневого, что характерно для *Lactobacillus spp.* (рисунок 11, таблица 4).

Таблица 4 – Рост *Lactobacillus spp.* на плотной неселективной питательной среде для культивирования микроорганизмов

Испытуемая культура Питательные среды	<i>Lactobacillus spp.</i>
Плотная неселективная питательная среда для культивирования микроорганизмов	+ + +
-//- с добавлением Пиобактериофага	+ + +

Примечание: «+» - наличие роста бактерий.

Установили, что на плотной неселективной питательной среде данный Пиобактериофаг также не влияет и не подавляет рост *Lactobacillus spp.*

Для дальнейшей идентификации микроорганизмов проводили окраску по Граму колоний, выросших на питательных средах. Стекло просматривали под иммерсионной системой микроскопа.

Результаты: *Lactobacillus spp.* – грамположительные палочки, располагаются поодиночке, в парах, в виде фигуры V-образной формы. Их размер составляет 1-8 мкм (рисунок 12-13).

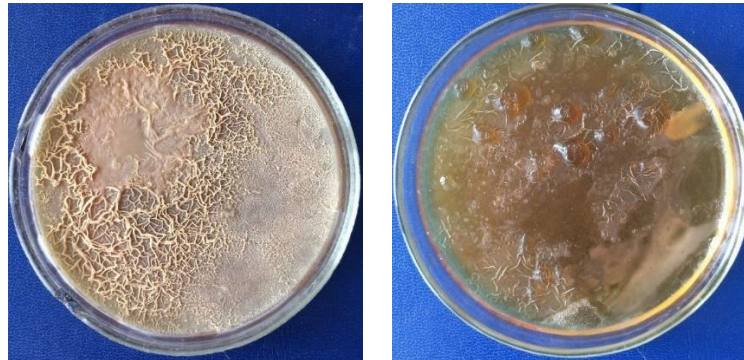


Рисунок 11 – Рост *Lactobacillus spp.* на плотной неселективной питательной среде для культивирования микроорганизмов

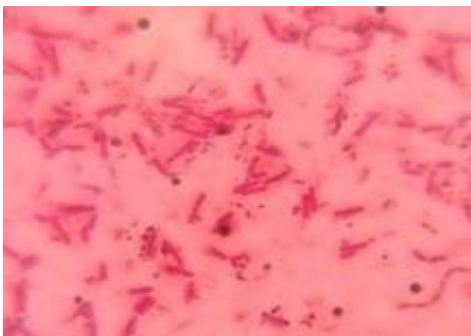


Рисунок 12 – Чистая культура *Lactobacillus spp.*, полученных на питательной среде без Пиобактериофага.  
Окраска по Граму.  $\times 1500$

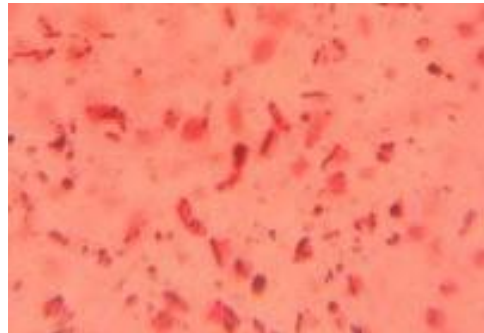


Рисунок 13 – Чистая культура *Lactobacillus spp.*, полученных на питательной среде с Пиобактериофагом.  
Окраска по Граму.  $\times 1500$

### 3.4. Определение исходной концентрации *Lactobacillus spp.* в клиническом материале

В составе микрофлоры при дисбиотических состояниях выделенной из клинического материала основную микробную массу составляют бактерии сопутствующей микрофлоры, а именно семейства

*Enterobacteriaceae*, родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и др. Поэтому необходимо провести оценку антимикробной активности Пиобактериофага в клиническом материале.

Материал для исследования – отделяемое с заднего свода влагалища. Пробоподготовка заключалась в проведении десятикратного разведения клинического материала.

Разведения проводили в пробирках (5 шт. на один клинический материал), содержащий по 4,5 мл жидкой селективной питательной среды. В первую пробирку внесли 0,1 г клинического материала и считали это разведение первым ( $10^{-1}$ ). Содержимое пробирки тщательно перемешали, после при помощи автоматического дозатора со съемными стерильными наконечниками с фильтром перенесли 0,5 мл суспензии во вторую пробирку, получив при этом второе разведение ( $10^{-2}$ ). Таким же образом провели подготовку и последующие разведения (до  $10^{-5}$ ). Пробирки инкубировали в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 24 ч.

Изъяв через 24 ч. из термостата 25 пробирок с 4,5 мл среды, в которых до этого было проведено десятикратное разведение клинического материала, результаты учитывали визуально. Присутствие лактобактерий установили по наличию диффузного помутнения по всему объему среды и прозрачной зоной в верхней части.

Из содержимого всех пробирок приготовили фиксированные препараты, для окраски по Граму. Отмечают по морфологии грамположительные палочки бактерий рода *Lactobacillus*, расположенные поодиночке или в парах.

Пробирки, в которых присутствовала кокковая флора или грамотрицательные палочки, нами не учитывались.

Оценку количественного содержания лактобактерий определяли по максимальному разведению, в котором были обнаружены типичные грамположительные палочки (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты определения исходной концентрации лактобактерий, КОЕ/г

№ клинического материала	Исходная концентрация лактобактерий, КОЕ/мл
1	$10^2$
2	10
3	$10^2$
4	$10^3$
5	$10^2$

### 3.5. Получение накопительных культур

Для дальнейшего удобства работы с бактериями выделенных из клинического материала, сохранения их для дальнейших опытов, нами было решено использование накопительных культур.

Приготовление накопительных культур производилось в жидкой питательной среде Бульон МРС для выделения и культивирования лактобактерий.

Эксперимент был разделен на 2 группы:

1. Контроль - стерильную среду в асептических условиях разлили в подготовленные 50 пробирок по 4,5 мл.

2. Опыт - стерильную среду в асептических условиях разлили в подготовленные 50 пробирок по 4,0 мл и добавили по 0,5 мл препарата «Пиобактериофаг».

Пробирки инкубировали в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 48-72 ч.

Строгая необходимость определения точных концентраций при работе с накопительной культурой, подразумевает ее разведение. Данная методика подразумевает изменение временного диапазона.

Через 48 ч. из термостата достали 5 пробирок с средой и 5 пробирок с средой и Пиобактериофагом.

Затем приготовили серию 10-кратных разведений полученных накопительных культур из опытных и контрольных пробирок.

Для пробирки №1 (контроль) разведения делали в 10 пробирках, содержащих по 4,5 мл жидкой селективной питательной среды, при помощи автоматического дозатора со съемными наконечниками, путем последовательного перенесения из пробирки в пробирку по 0,5 мл. Титрование по 0,5 мл производили до  $10^{-10}$ .

Для пробирки №1БФ (опыт) разведения делали в 10 пробирках, содержащих по 4,0 мл жидкой селективной питательной среды и 0,5 мл препарата «Пиобактериофаг».

Аналогичные действия повторяют с накопительными культурами №4, №4БФ, №5, №5БФ, №6, №6БФ, №7, №7БФ.

Пробирки с последними пятью разведениями с  $10^{-6}$  до  $10^{-10}$  инкубировали в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 24 ч.

### **3.6. Сравнение конечной концентрации *Lactobacillus spp.* в образцах с и без Пиобактериофага**

Наличие бактериофага в среде является фактом, способствующим наилучшему развитию *Lactobacillus spp.* Это удалось выяснить в ходе следующего опыта.

Через 24 ч. из термостата мы достали 25 пробирок с средой и 25 пробирок с средой и Пиобактериофагом.



Результат снова учитывали визуально. Присутствие *Lactobacillus spp.* установили по наличию диффузного помутнения по всему объему среды и прозрачной зоной в верхней части.

Из содержимого пробирок готовили фиксированные препараты, для окраски по Граму. Отметили по морфологии грамположительные палочки бактерий рода *Lactobacillus*, расположенные поодиночке, в парах.

Пробирки, в которых обнаружены кокковая флора или грамотрицательные палочки, не учитывали.

Оценку количественного содержания *Lactobacillus spp.* определяли по максимальному разведению, в котором обнаружены типичные грамположительные палочки.

Таблица 6 – Клинический материал №1

Разведение	Морфо-тинкториальные признаки (обнаружены / не обнаружены Гр+ палочки)	
	Клинический материал №1 (без Пиобактериофага)	Клинический материал №1БФ (с Пиобактериофагом)
$10^{-6}$	Гр+ палочки	Гр+ палочки
$10^{-7}$	Гр+ палочки	Гр+ палочки
$10^{-8}$	Гр+ палочки	Гр+ палочки
$10^{-9}$	не обнаружено	Гр+ палочки
$10^{-10}$	не обнаружено	не обнаружено

Вывод по клиническому материалу №1: Конечная концентрация *Lactobacillus spp.* в опытной пробирке с добавлением Пиобактериофага составила  $10^9$  КОЕ/мл, в контрольной –  $10^8$  КОЕ/мл.



Рисунок 14 – Клинический материал №1 (без Пиобактериофага),  
разведение  $10^{-9}$ . Окраска по Граму  $\times 1500$

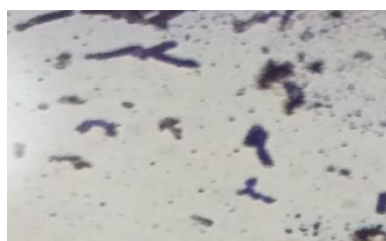


Рисунок 15 – Клинический материал №1БФ (с Пиобактериофагом),  
разведение  $10^{-8}$ . Окраска по Граму  $\times 1500$

Таблица 7 – Клинический материал №2

Разведение	Морфо-тинкториальные признаки (обнаружены / не обнаружены Гр+ палочки)	
	Клинический материал №2 (без Пиобактериофага)	Клинический материал №2БФ (с Пиобактериофагом)
$10^{-6}$	Гр+ палочки	Гр+ палочки
$10^{-7}$	не обнаружено	Гр+ палочки
$10^{-8}$	не обнаружено	Гр+ палочки
$10^{-9}$	не обнаружено	не обнаружено
$10^{-10}$	не обнаружено	не обнаружено

Вывод по клиническому материалу №2: Конечная концентрация *Lactobacillus spp.* в опытной пробирке с добавлением Пиобактериофага составила  $10^8$  КОЕ/мл, в контрольной –  $10^6$  КОЕ/мл.



Рисунок 16 – Клинический материал №1 (без Пиобактериофага),  
разведение  $10^{-6}$ . Окраска по Граму  $\times 1500$



$10^{-8}$

$10^{-7}$

$10^{-6}$

Рисунок 17 – Клинический материал №1БФ (с Пиобактериофагом).  
Цифрами указаны разведения. Окраска по Граму  $\times 1500$

Таблица 8 – Клинический материал №3

Разведение	Морфо-тинкториальные признаки (обнаружены / не обнаружены Гр+ палочки)	
	Клинический материал №3 (без Пиобактериофага)	Клинический материал №3БФ (с Пиобактериофагом)
$10^{-6}$	Гр+ палочки	Гр+ палочки
$10^{-7}$	Гр+ палочки	Гр+ палочки
$10^{-8}$	не обнаружено	Гр+ палочки
$10^{-9}$	не обнаружено	Гр+ палочки
$10^{-10}$	не обнаружено	не обнаружено

Вывод по клиническому материалу №3: Конечная концентрация *Lactobacillus spp.* в опытной пробирке с добавлением Пиобактериофага составила  $10^9$  КОЕ/мл, в контрольной –  $10^7$  КОЕ/мл.


 $10^{-9}$ 

 $10^{-8}$ 

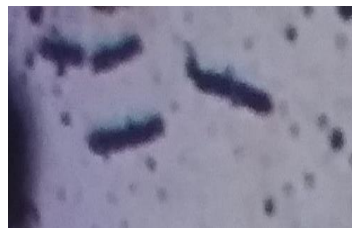
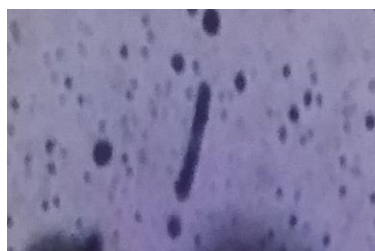
 $10^{-7}$ 

 $10^{-6}$ 

Рисунок 18 – Клинический материал №3 (без Пиобактериофага).

Цифрами указаны разведения. Окрашка по Граму  $\times 1500$


 $10^{-9}$ 

 $10^{-8}$ 

 $10^{-7}$ 

 $10^{-6}$ 

Рисунок 19 – Клинический материал №3БФ (с Пиобактериофагом).

Цифрами указаны разведения. Окрашка по Граму  $\times 1500$

Таблица 9 – Клинический материал №4

Разведение	Морфо-тинкториальные признаки (обнаружены / не обнаружены Гр+ палочки)	
	Клинический материал №4 (без Пиобактериофага)	Клинический материал №4БФ (с Пиобактериофагом)
$10^{-6}$	Гр+ палочки	Гр+ палочки
$10^{-7}$	Гр+ палочки	Гр+ палочки
$10^{-8}$	Гр+ палочки	Гр+ палочки
$10^{-9}$	не обнаружено	Гр+ палочки
$10^{-10}$	не обнаружено	не обнаружено

Вывод по клиническому материалу №4: Конечная концентрация *Lactobacillus spp.* в опытной пробирке с добавлением Пиобактериофага составила  $10^9$  КОЕ/мл, в контрольной –  $10^8$  КОЕ/мл.

Таблица 10 – Клинический материал №5

Разведение	Морфо-тинкториальные признаки (обнаружены / не обнаружены Гр+ палочки)	
	Клинический материал №5 (без Пиобактериофага)	Клинический материал №5БФ (с Пиобактериофагом)
$10^{-6}$	Гр+ палочки	Гр+ палочки
$10^{-7}$	не обнаружено	Гр+ палочки
$10^{-8}$	не обнаружено	Гр+ палочки
$10^{-9}$	не обнаружено	Гр+ палочки
$10^{-10}$	не обнаружено	не обнаружено

Вывод по клиническому материалу №5: Конечная концентрация *Lactobacillus spp.* в опытной пробирке с добавлением Пиобактериофага составила  $10^9$  КОЕ/мл, в контрольной –  $10^6$  КОЕ/мл.

Таблица 11 – Результаты определения исходной и конечной концентрации лактобактерий, КОЕ/мл

№	Исходная концентрация лактобактерий, КОЕ/мл	Конечная концентрация лактобактерий (контроль), КОЕ/мл	Конечная концентрация лактобактерий (с Пиобактериофагом), КОЕ/мл
1	$10^2$	$10^8$	$10^9$
2	10	$10^6$	$10^8$
3	$10^2$	$10^7$	$10^9$
4	$10^3$	$10^8$	$10^9$
5	$10^2$	$10^6$	$10^9$

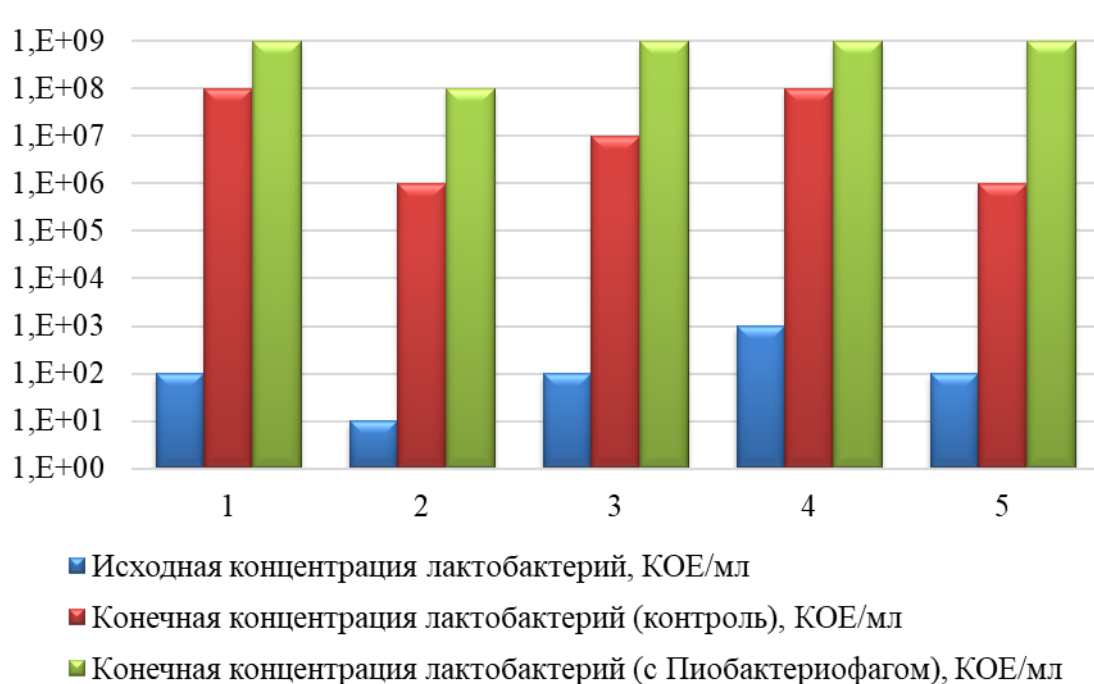


Рисунок 20 – Результаты определения исходной и конечной концентрации лактобактерий, КОЕ/мл

Среднее значение исходной концентрации лактобактерий в клинических материалах составила  $2,62 \times 10^2$  КОЕ/мл (таблица 12).

Конечная концентрация лактобактерий, по сравнению с исходной, в питательной среде с Пиобактериофагом увеличилась в  $10^6$  раз (среднее значение  $8,20 \times 10^8$  КОЕ/мл), различия статистически значимы ( $p=0.004722$ , значение t-критерия Стьюдента 4.07, таблица 13), в то время как в среде без модификаций концентрация увеличилась в  $10^5$  раз (среднее значение  $4,24 \times 10^7$  КОЕ/г), различия статистически не значимы ( $p=0.151694$ , значение t-критерия Стьюдента 1.61).

Таким образом, модификация питательной среды Бульон MRS с использованием Пиобактериофага позволяет повысить выход биомассы лактобактерий в среднем в 19,34 раз, различия статистически значимы ( $p=0.006448$ , значение t-критерия Стьюдента 3.83)

Таблица 12 – Статистический анализ полученных данных

	Исходная концентрация лактобактерий, КОЕ/мл	Конечная концентрация лактобактерий (контроль), КОЕ/мл	Конечная концентрация лактобактерий (с Пиобактериофагом), КОЕ/мл
Среднее	262	4,24E+07	8,20E+08
Стандартная ошибка	185,32	2,36E+07	1,80E+08
Медиана	100	1,00E+07	1,00E+09
Мода	100	1,00E+08	1,00E+09
Стандартное отклонение	414,39	5,27E+07	4,02E+08
Дисперсия выборки	1,72E+05	2,78E+15	1,62E+17

Таблица 13 – Расчет t-критерия Стьюдента при сравнении средних величин

	Группы сравнения		
	Исходная / Конечная (контроль)	Исходная / Конечная (Пиобактериофаг)	Конечная (контроль) / Конечная (Пиобактериофаг)
Значение t- критерия Стьюдента	1.61	4.07	3.83
Значение p	0.151694	0.004722 *	0.006448 *
Число степеней свободы, f	8	8	8
Критическое значение t- критерия Стьюдента	2.306	2.306	2.306
Уровень значимости, $\alpha$	0,05	0,05	0,05

Примечание: \* - различия статистически значимы

### 3.7. Анализ активности Пиобактериофага по отношению к штаммам *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus faecium*

В составе микрофлоры при дисбиотических состояниях основную микробную массу составляют бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, родов *Staphylococcus* и *Streptococcus*. Поэтому для возможности выделения *Lactobacillus spp.* необходимо было провести оценку антимикробной



активности Пиобактериофага по отношению к указанным микроорганизмам. Для этого использовали чистые культуры *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus faecium*.

Для культивирования различных микроорганизмов, неприхотливых по своим питательным потребностям, таких как энтеробактерии, синегнойная палочка, стафилококки, а также для проводимого исследований в санитарной и клинической микробиологии использовали «Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-бульон Оболенск). «ГРМ-бульон» представляет собой мелкодисперсный гигроскопичный порошок светло-желтого цвета. Культивирование микроорганизмов в жидкой питательной среде осуществлялась микробиологическим методом. Принцип метода — визуальное обнаружение роста культур, выделенных из исследуемых образцов, по помутнению среды.

Стерильный ГРМ-бульон в асептических условиях разливали в подготовленные 44 пробирки по 10,0 мл. В первые 22 пробирки добавляли по 1,0 мл препарата «Пиобактериофаг» (опыт), во вторые 22 пробирки — 1,0 мл дистиллированной воды (контроль).

В каждые 3 пробирки с ГРМ-бульоном и Пиобактериофагом (опыт) и 3 с ГРМ-бульоном без Пиобактериофага (контроль) проводили посев бактериологической петлей чистых культур *Escherichia coli* ФПМ 1, *Klebsiella pneumonia* ФПМ 2, *Staphylococcus aureus* ФПМ 3, *Pseudomonas aeruginosa* ФПМ 4, *Candida albicans* ФПМ 5, *Streptococcus spp.* ФПМ 6, *Enterococcus faecium* ФПМ 7. Для контроля стерильности среды, оставшиеся по одной контрольной и опытной пробирки, не засеивали культурами.

Пробирки инкубировали в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 24 ч.



Рисунок 21. Приготовление питательной среды



Рисунок 22. Чистые культуры *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*

В результате на всех пробирках с ГРМ-бульоном с посевами микроорганизмов отмечали диффузное помутнение среды.

В пробирках с ГРМ-бульоном с добавлением Пиобактериофага отсутствовал рост бактерий (таблица 14).

Таблица 14 – Рост условно-патогенных микроорганизмов в ГРМ-бульоне

Испытуемые культуры								
	<i>Escherichia coli</i> ФПМ 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ФПМ 2	<i>Staphylococcus aureus</i> ФПМ 3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ФПМ 4	<i>Candida albicans</i> ФПМ 5	<i>Streptococcus spp.</i> ФПМ 6	<i>Enterococcus faecium</i> ФПМ 7	Без бактерий
Питательные среды								
ГРМ-бульон	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---
-/- с добавлением Пиобактериофага	---	---	---	---	---	---	---	---

Примечание: «—» - отсутствие роста бактерий; «+» - наличие роста бактерий.

Таким образом, на неселективном ГРМ-бульоне с Пиобактериофагом подавляется рост условно-патогенных микроорганизмов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus faecium*.

Однако питательная среда ГРМ-бульон не обладала достаточными ростовыми свойствами для культивирования бактерий рода *Lactobacillus*. В связи с этим был проведен сравнительный анализ элективной активности селективной питательной среды Бульон МРС для выделения *Lactobacillus spp.* с и без добавления Пиобактериофага.

Стерильный Бульон МРС для лактобактерий в асептических условиях разлили в подготовленные 44 пробирки по 10,0 мл. В первые 22 пробирки добавляют по 1,0 мл препарата «Пиобактериофаг» (опыт), во вторые 22 пробирки – 1,0 мл дистиллированной воды (контроль).

В каждые 3 пробирки с Бульоном МРС и Пиобактериофагом (опыт) и 3 с Бульоном МРС без Пиобактериофага (контроль) проводили посев бактериологической петлей чистых культур *Escherichia coli* ФПМ 1, *Klebsiella pneumonia* ФПМ 2, *Staphylococcus aureus* ФПМ 3, *Pseudomonas aeruginosa* ФПМ 4, *Candida albicans* ФПМ 5, *Streptococcus spp.* ФПМ 6, *Enterococcus faecium* ФПМ 7. Для контроля стерильности среды, оставшиеся по одной контрольной и опытной пробирки не засеяли культурами. Пробирки инкубировали в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 24 ч.

В результате в пробирках с Бульоном МРС (без модификаций) при росте *Escherichia coli* наблюдалось диффузное помутнение столбика среды с газообразованием в виде пены, *Candida albicans* и *Enterococcus faecium* - диффузное помутнение среды.

В пробирках с Бульоном МРС с добавлением Пиобактериофага отсутствовал рост бактерий (таблица 15).

Таблица 15 – Рост условно-патогенных микроорганизмов в Бульоне МРС

Испытуемые культуры Питательные среды	<i>Escherichia coli</i> ФПМ 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ФПМ 2	<i>Staphylococcus aureus</i> ФПМ 3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ФПМ 4	<i>Candida albicans</i> ФПМ 5	<i>Streptococcus spp.</i> ФПМ 6	<i>Enterococcus faecium</i> ФПМ 7	Без бактерий
	+++	---	---	---	+++	---	+++	---
Бульон МРС	+++	---	---	---	+++	---	+++	---
-/- с добавлением Пиобактериофага	---	---	---	---	---	---	---	---

Примечание: «-» - отсутствие роста бактерий; «+» - наличие роста бактерий.

Таким образом, нам удалось выяснить, что в Бульоне МРС с Пиобактериофагом подавляется рост условно-патогенных микроорганизмов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus faecium*.

Предлагаемая модифицированная среда для лактобактерий с добавлением Пиобактериофага имеет преимущество, так как на ней подавляется рост *Escherichia coli*, *Candida albicans* и *Enterococcus faecium*.

Таким образом, мы повысили селективные и ингибирующие свойства известной питательной среды.

### 3.8. Выделение чистой культуры бактерий *Lactobacillus spp.* из накопительных культур

Аксеничная система обладает одинаковыми морфологическими и биохимическими свойствами и проявляет единообразие вида. Поэтому для

дальнейших исследований было принято решение о выделении чистой культуры.

Использовалась питательная среда для выделения и культивирования *Lactobacillus spp.* Бульон МРС, производство HiMedia.

Чистые культуры штаммов лактобактерий получали из накопительных культур, полученных из клинического материала, на питательной среде с Пиобактериофагом. Для этого провели рассев материала по методу Коха в 3 чашки Петри. На поверхность питательной среды в чашке № 1 наносили бактериологической петлей каплю накопительной культуры и распределяли ее по всей поверхности. После петлю достали, чашку быстро закрыли и переносили петлю в чашку № 2, не стерилизуя его. Распределяли культуру по всей поверхности среды. Точно те же действия провели и в чашке № 3, после чего петлю простерилизовали (рисунок 23).

Засеянные чашки поместили в термостат в эксикатор и инкубировали в течение 24-48 ч при 37°C.

Через 24 ч оценили рост колоний бактерий на 15 чашек Петри (рисунок 24-28).

Изолированные колонии, морфологически соответствующие росту бактерий рода *Lactobacillus*, выросшие на плотных питательных среды, пересеяли в пробирки с стерильной жидкой питательной средой Бульон МРС, которую в асептических условиях разлили в подготовленные 26 пробирок по 10,0 мл.

В 26-ю пробирку пересеяли *Lactobacillus plantarum* из флакона с лиофилизированным пробиотиком Лактобактерин.

Пробирки инкубировали в термостате в анаэробных условиях (эксикатор со свечкой) при 37°C в течение 24 ч.



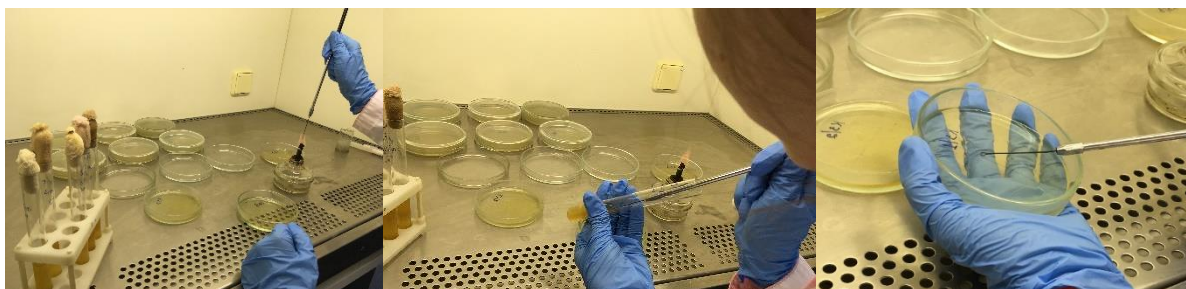


Рисунок 23 – Ход работы

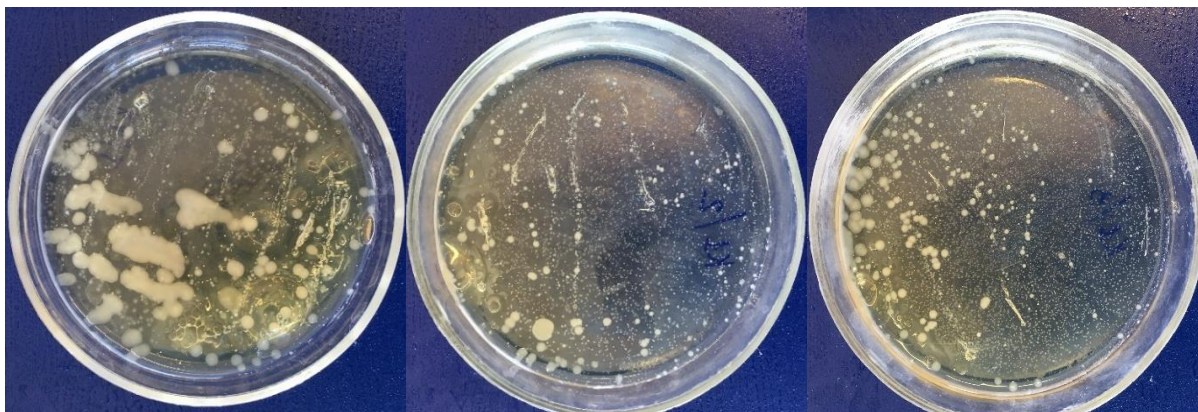


Рисунок 24 – Клинический материал №1БФ. Метод Коха.

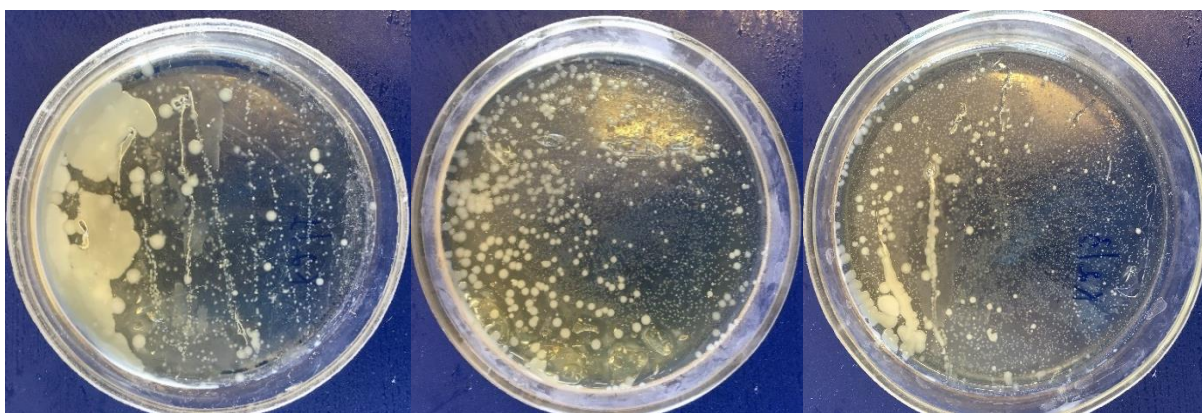


Рисунок 25 – Клинический материал №2БФ. Метод Коха.



Рисунок 26 – Клинический материал №3БФ. Метод Коха.



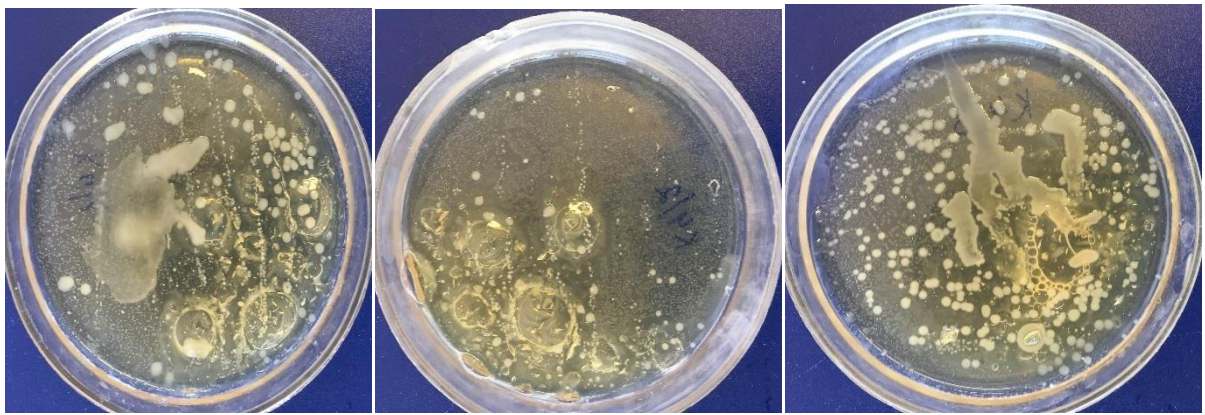


Рисунок 27 – Клинический материал №4БФ. Метод Коха.

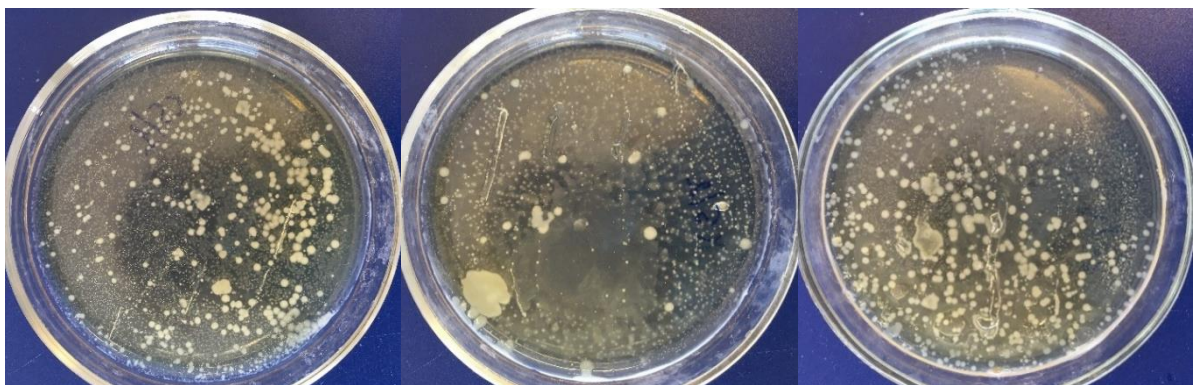


Рисунок 28 – Клинический материал №5БФ. Метод Коха.

Были отобраны чистые культуры, образующие колонии, морфологически соответствующие росту бактерий рода *Lactobacillus*, т.е. диффузное помутнение по всему объему среды и прозрачной зоной в верхней части.

Из образцов с наличием роста готовили фиксированные препараты, окрашивали по Граму и учитывали морфо-тинкториальные признаки, характерные для лактобактерий: грамположительные палочки, неспорообразующие, располагаются поодиночке, в парах.

### 3.9. Идентификация исследуемых образцов до рода

Выделение ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты) является важной частью лабораторных исследований по выявлению семейств бактерий, определению принадлежности образцов тому или иному виду.

Незаменим этот этап и при осуществлении ПЦР-анализа, процедура выполнялась в лабораторных условиях с соблюдением строгих требований стерильности, так как даже в воздухе тщательно убранного помещения могут быть обнаружены частички пыли и неразличимых мельчайших биологических объектов (например, споры грибов), содержащих гены живых организмов.

Для выделения ДНК использовали набор реагентов «Лизирующий раствор (Р)» (Вектор-Бест). Набор представляет собой пробирки объемом 1,5 мл, содержащие по 0,5 мл лизирующего раствора.

Нами была выбрана методика ПЦР в режиме реального времени, т.к. ее основное отличие состоит в том, что при проведении Real-Time ПЦР одновременно происходят амплификация, детекция и количественное определение специфической последовательности ДНК в образце. Также отличительными чертами данного метода являются отсутствие стадии электрофореза, менее строгие требования к организации ПЦР-лаборатории и автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов.

Для ПЦР в режиме реального времени использовали амплификатор CFX96 Touch™ («BioRad», США).

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, деионизированную воду, кроме праймеров и зондов.

Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом в 25 мкл, содержащей 3 мкл исследуемого образца ДНК, 10 мкл 2,5× ПЦР-микс, по 1 мкл прямого и обратного праймера, 10 мкл  $ddH_2O$ .

Подготовили и расставили в штативе 26 пробирок с выделенной ДНК, 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I,  $ddH_2O$ , растворы пары родоспецифичных праймеров *Lactobacillus spp.*, положительный



контрольный образец (ПКО)с ДНК лактобактерий, ПКО с ДНК лактобактерий для разморозки.

В штатив подготовили стерильную пробирки объемом 1,5 мл.

В пробирке приготовили общую реакционную смесь для лактобактерий (с расчетом на 30 пробирок): добавили 300 мкл ddH<sub>2</sub>O, 300 мкл 2,5х-ной реакционной смеси SYBR Green I, по 30 мкл каждого праймера из пары родоспецифичных *Lactobacillus spp.* Тщательно перемешали на вортексе.

Отобрали пинцетом 29 одноразовых стерильных полипропиленовых пробирок объемом 0,2 мл и расставили в штатив соответствующим образом.

В 29 подготовленные пробирки внесли по 22 мкл общую реакционную смесь для лактобактерий, используя наконечник с фильтром.

В каждую пробирку внесли по 3 мкл ДНК исследуемого образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром, по порядку с 1 по 26, затем в следующие пробирки внесли ПКО *Lactobacillus spp.* (ПКЛ), ПКО бифидобактерии (ПКБ), в качестве отрицательного контроля в последних пробирках использовали 3 мкл ddH<sub>2</sub>O.

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

На приборе создать эксперимент с соответствующими параметрами плашки: размер, тип, режим сканирования, флуорофор, названия проб; указали объем реакционной смеси в одной пробирке. Затем запустили программу с параметрами.

Учет результатов проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Результаты представлены в виде графиков амплификации. По окончании амплификации по показателю индикаторного цикла отметили положительные и отрицательные результаты (таблица 16, рисунок 30-40).

В результате из клинического материала было выделено 9 штаммов *Lactobacillus spp.*, идентифицированных до рода, а также чистая культура *Lactobacillus plantarum* из пробиотика Лактобактерин (Л26).



Рисунок 29 – Амплификатор CFX-96 «REALTIME» (Bio-Rad США)

### Таблица 16 – Результаты амплификации

[illegible]

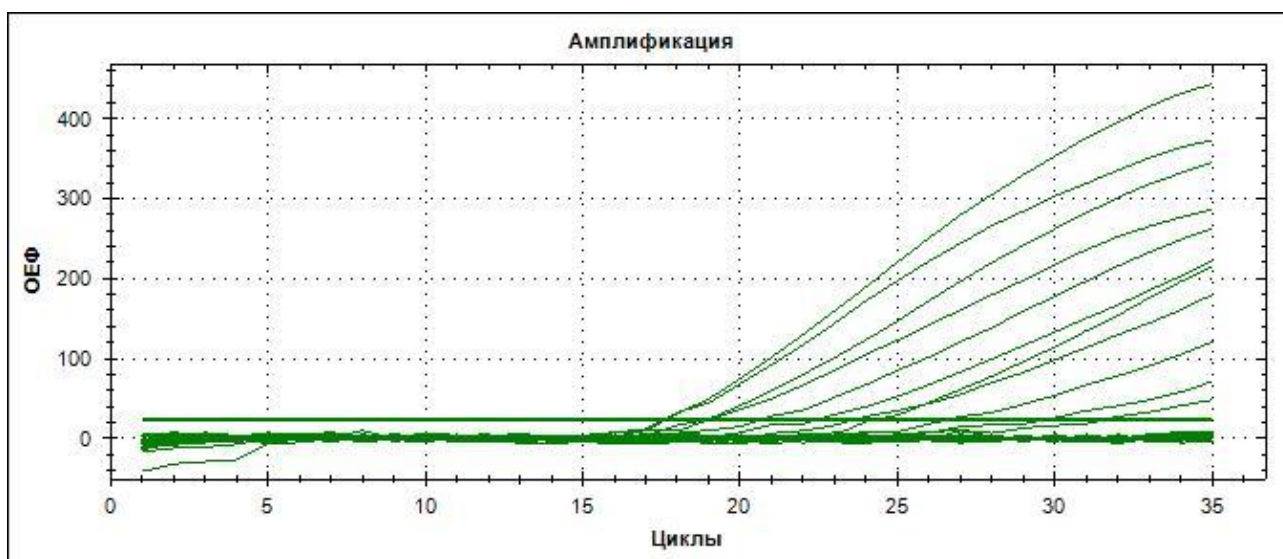


Рисунок 30 – Результаты амплификации ДНК, выделенных из полученных культур, с родоспецифичными праймерами *Lactobacillus spp.*

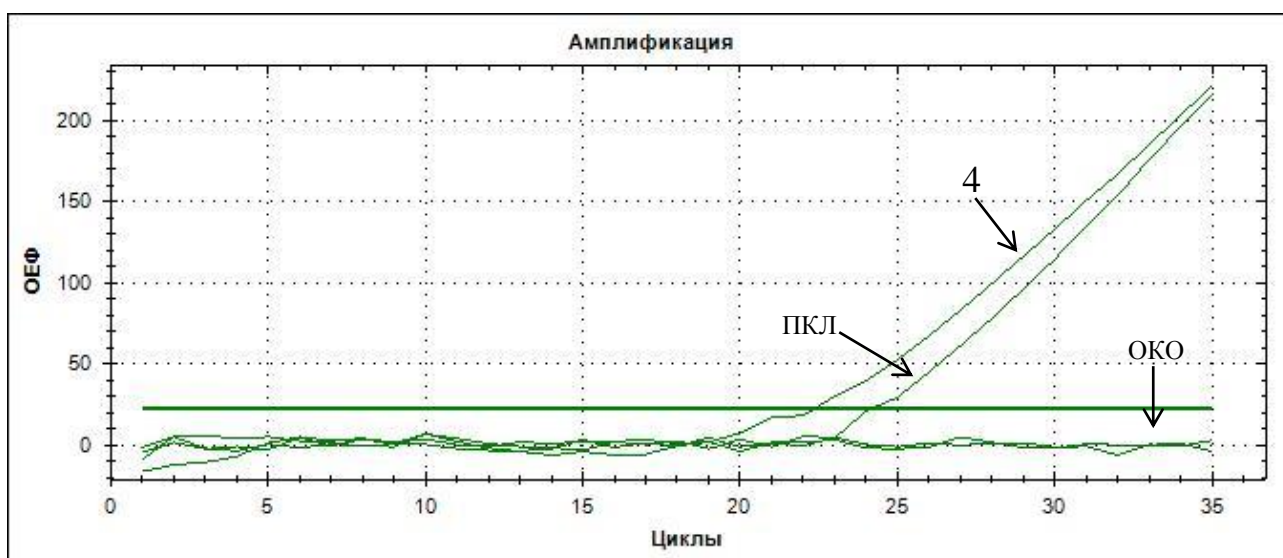


Рисунок 31 – Результаты амплификации ДНК культуры 4 с родоспецифичными праймерами *Lactobacillus spp.* Культура 4 – положительный, ПК лактобактерии – положительный, ОКО – отрицательный

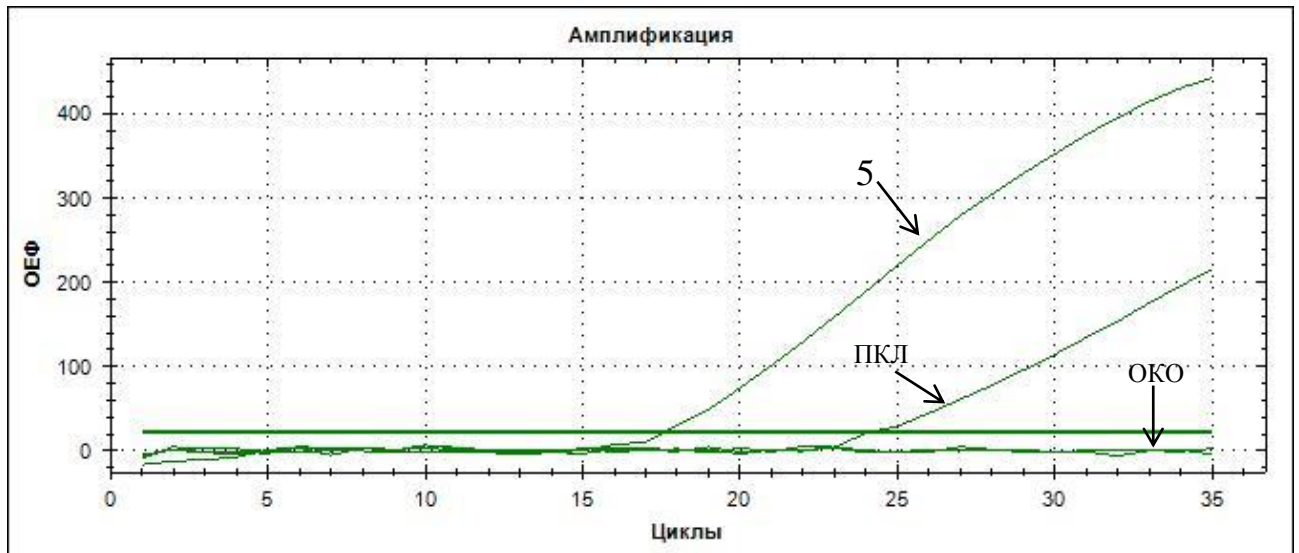


Рисунок 32 – Результаты амплификации ДНК культуры 5 с родоспецифичными праймерами *Lactobacillus spp.* Культура 5 – положительный, ПК лактобактерии – положительный, ОКО – отрицательный

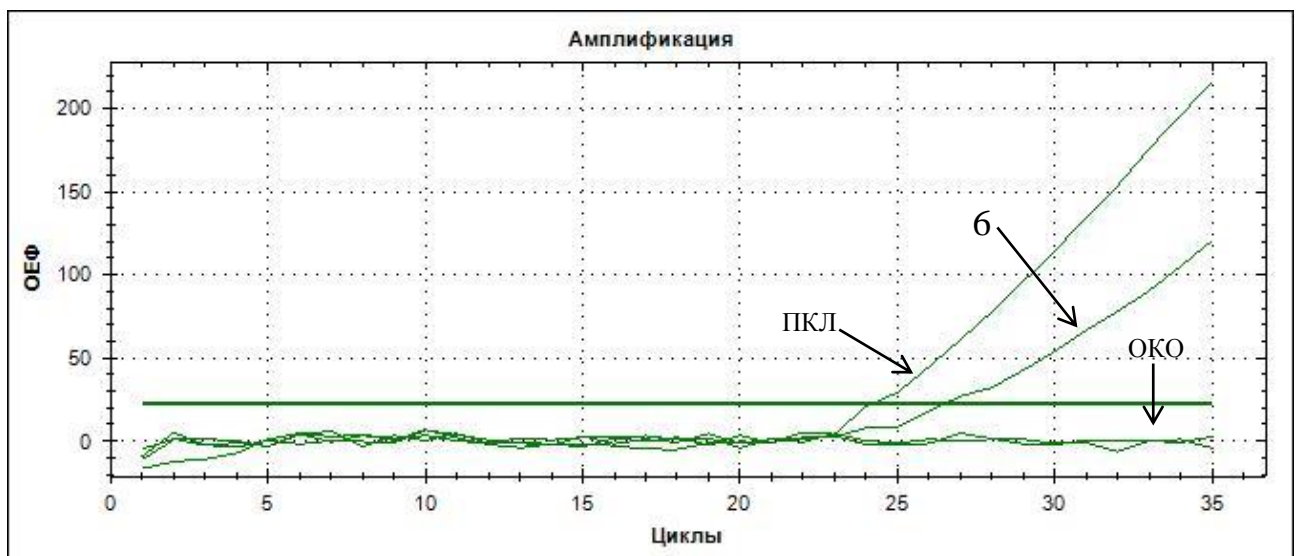


Рисунок 33 – Результаты амплификации ДНК культуры 6 с родоспецифичными праймерами *Lactobacillus spp.* Культура 6 – положительный, ПК лактобактерии – положительный, ОКО – отрицательный

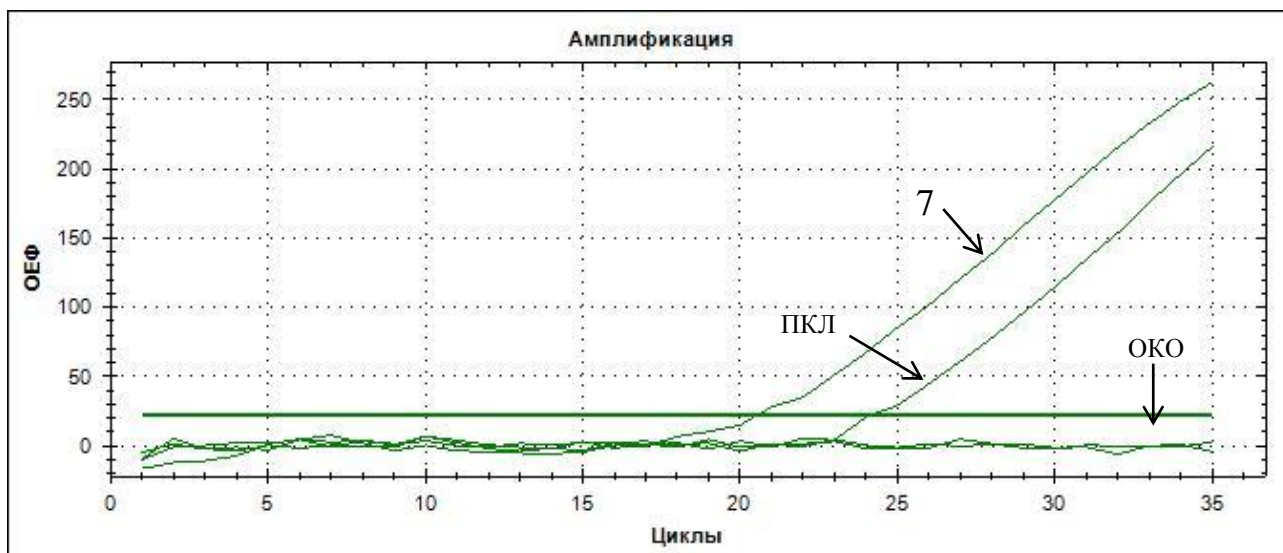


Рисунок 34 – Результаты амплификации ДНК культуры 7 с родоспецифичным ипраймерами *Lactobacillus spp.* Культура 7 – положительный, ПК лактобактерии – положительный, ОКО – отрицательный

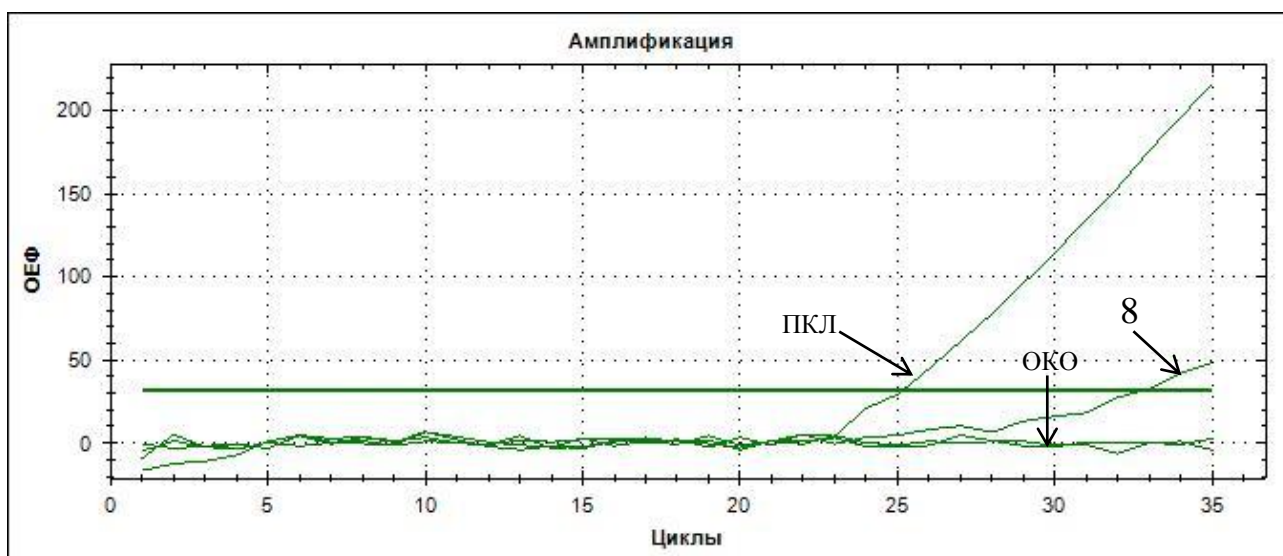


Рисунок 35 – Результаты амплификации ДНК культуры 8 с родоспецифичными праймерами *Lactobacillus spp.* Культура 8 – положительный, ПК лактобактерии – положительный, ОКО – отрицательный



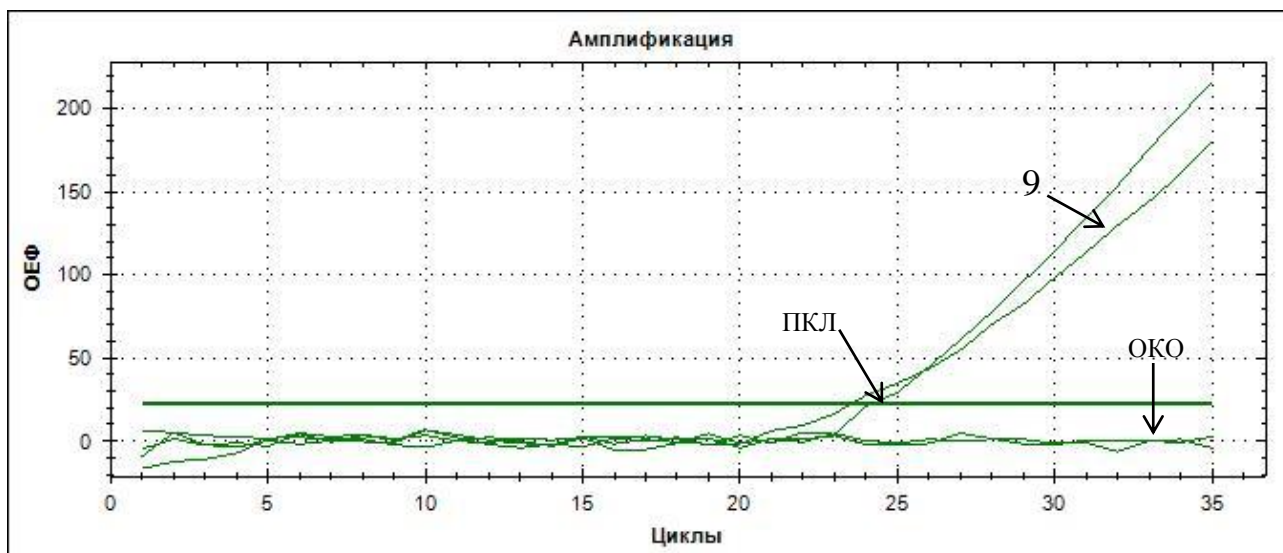


Рисунок 36 – Результаты амплификации ДНК культуры 9 с родоспецифичными праймерами *Lactobacillus spp.* Культура 9 – положительный, ПК лактобактерии – положительный, ОКО – отрицательный

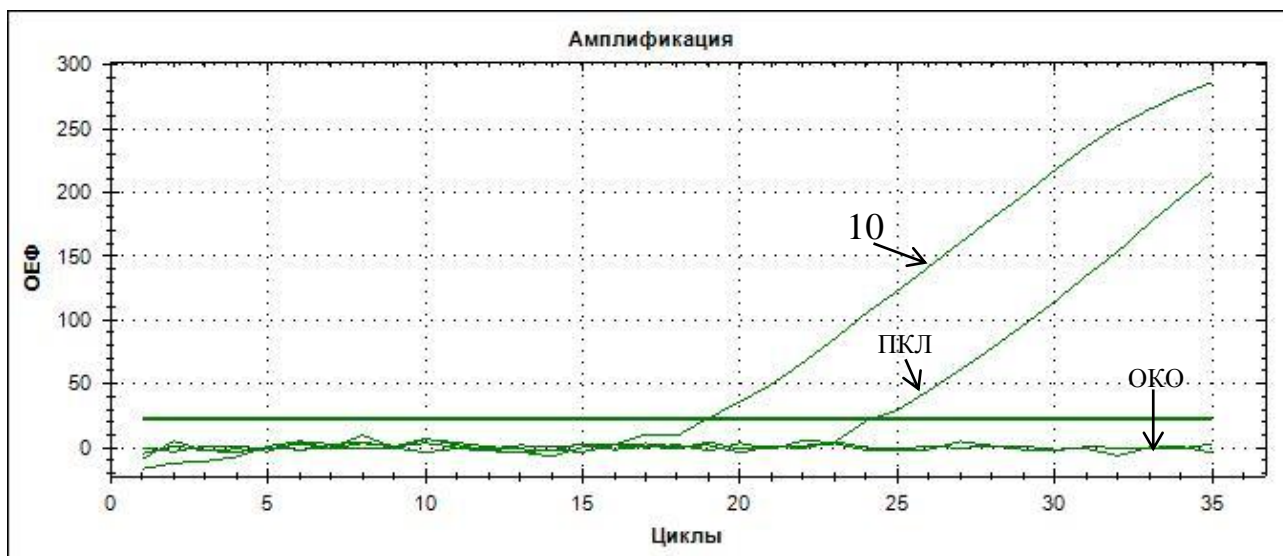


Рисунок 37 – Результаты амплификации ДНК культуры 10 с родоспецифичными праймерами *Lactobacillus spp.* Культура 10 – положительный, ПК лактобактерии – положительный, ОКО – отрицательный

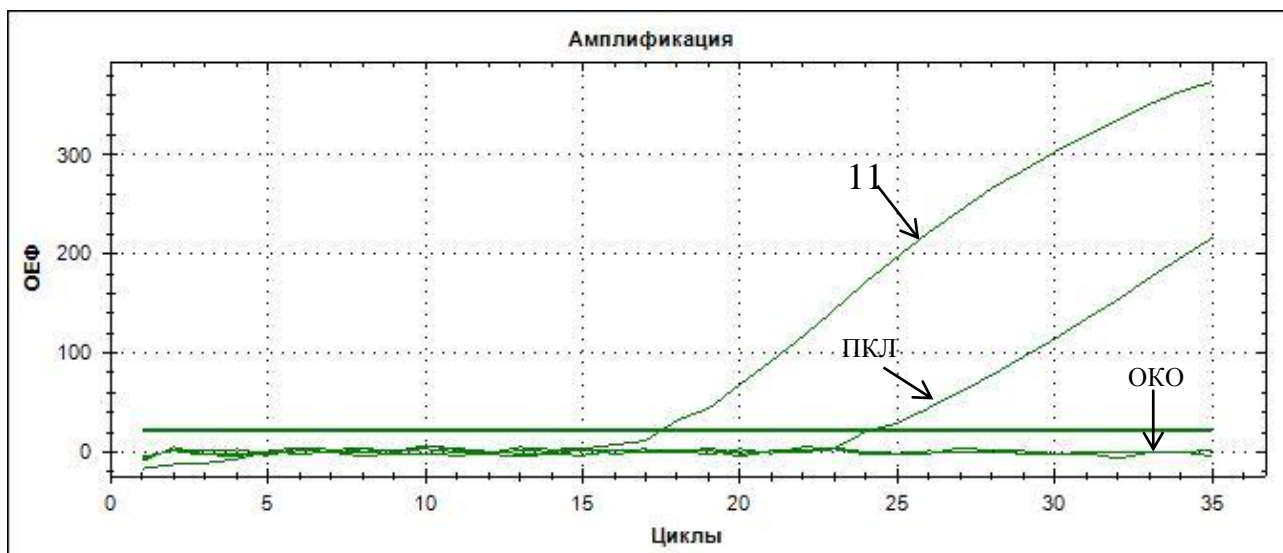


Рисунок 38 – Результаты амплификации ДНК культуры 11 с родоспецифичными праймерами *Lactobacillus spp.* Культура 11 – положительный, ПК лактобактерии – положительный, ОКО – отрицательный

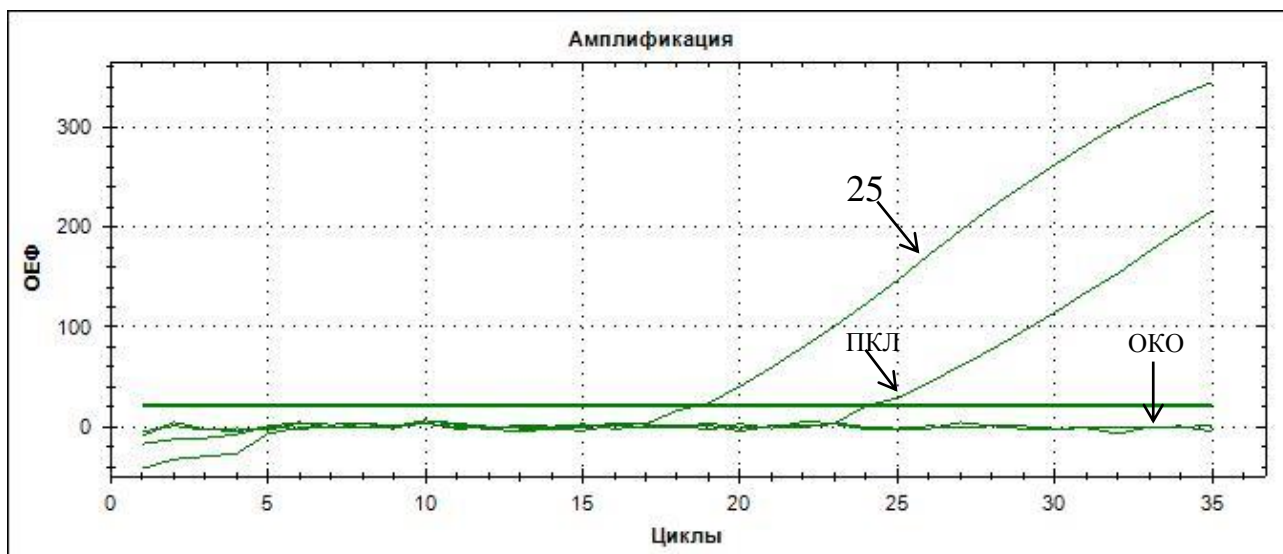


Рисунок 39 – Результаты амплификации ДНК культуры 25 с родоспецифичными праймерами *Lactobacillus spp.* Культура 25 – положительный, ПК лактобактерии – положительный, ОКО – отрицательный

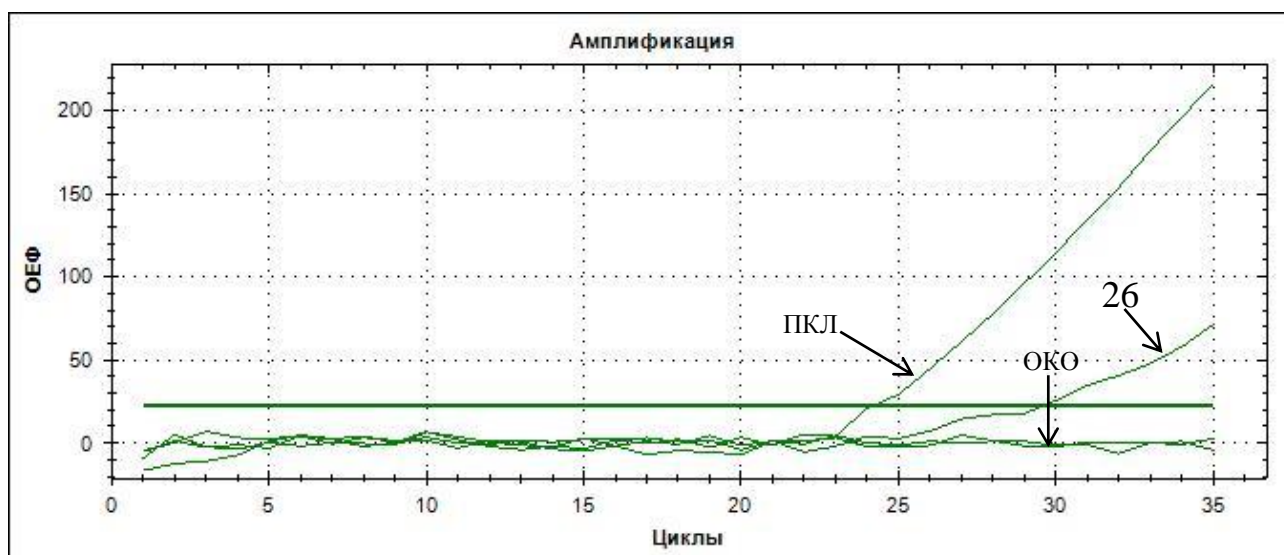


Рисунок 40 – Результаты амплификации ДНК культуры 26 (Лактобактерин) с родоспецифичными праймерами *Lactobacillus spp.* Культура 26 – положительный, ПК лактобактерии – положительный, ОК – отрицательный

### 3.10. Оценка антагонистической активности

Антагонистическую активность *Lactobacillus spp.* определяли путем подсева перпендикулярных штрихов условно-патогенных микроорганизмов.

Для оценки антагонистической активности использовались микроорганизмы из пробирок №4,5,6,17,8,9,10,11,25,26 с положительным результатом ПЦР на принадлежность к роду *Lactobacillus*.

Чашки Петри подписывали соответственно номерам чистых культур.

На всех чашках по центру по диаметру маркером и линейкой нарисовали прямую линию.

На поверхность агаризованной среды в чашке Петри засеяли штрихом исследуемый микроб-антагонист, продуцирующий антибактериальное вещество. Посев делают по диаметру чашки, которую затем поместили в термостат (эксикатор) при температуре, оптимальной для роста, 37°C на 24ч.



После завершения роста и диффузии продуцируемого вещества в агаризованную среду, перпендикулярно к выросшему штриху, подсевали штрихами изоляты условно-патогенных микроорганизмов: *Escherichia coli* ФПМ 1, *Staphylococcus aureus* ФПМ 3, *Pseudomonas aeruginosa* ФПМ 4, *Enterococcus faecalis* ФПМ 7 (рисунок 41).

Чашки поместили в термостат на 24 ч.

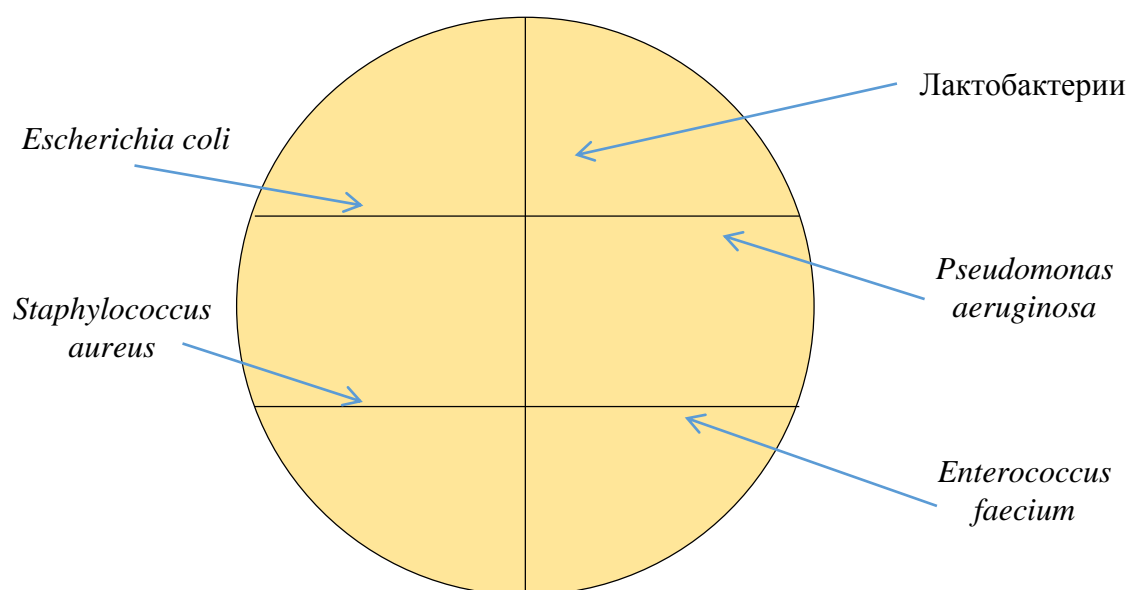


Рисунок 41 – Метод перпендикулярных штрихов

Если изучаемый микроорганизм антагонист образует диффундирующее в среду вещество, оказывающее антимикробное действие в отношении тест-культур, то рост последних будет начинаться на некотором расстоянии от роста самого антагониста. Чем больше это расстояние, тем более чувствительна тест-культура к продуцируемому антибиотическому веществу. Величина зоны отсутствия роста (в мм) указывает на степень активности данного штамма лактобактерий в отношении индикаторных штаммов. Нечувствительные микроорганизмы развивались в непосредственной близости от штриха.

В результате проведенных исследований нами установлено, что все исследуемые *Lactobacillus spp.* по силе воздействия обладали различной активностью по отношению к условно-патогенным микроорганизмам.

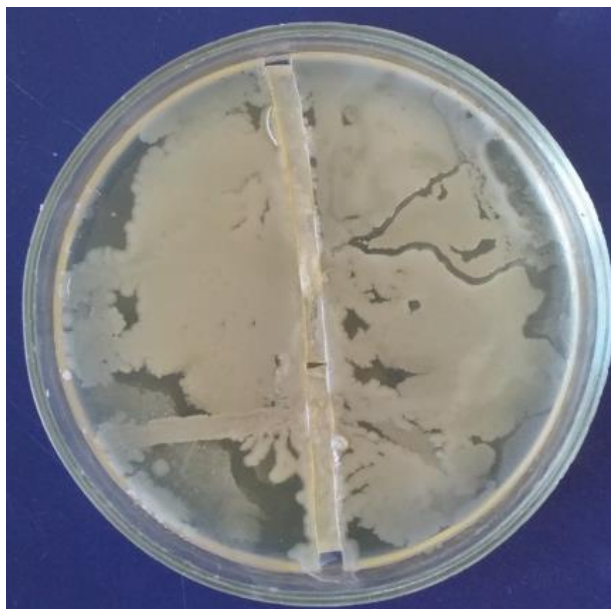


Рисунок 42 – Культура Л4



Рисунок 43 – Культура Л5



Рисунок 44 – Культура Л6



Рисунок 45 – Культура Л7



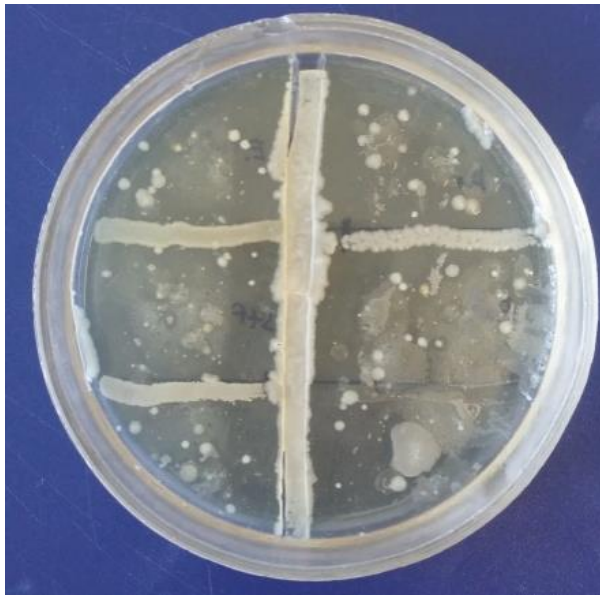


Рисунок 46 – Культура Л8



Рисунок 47 – Культура Л9

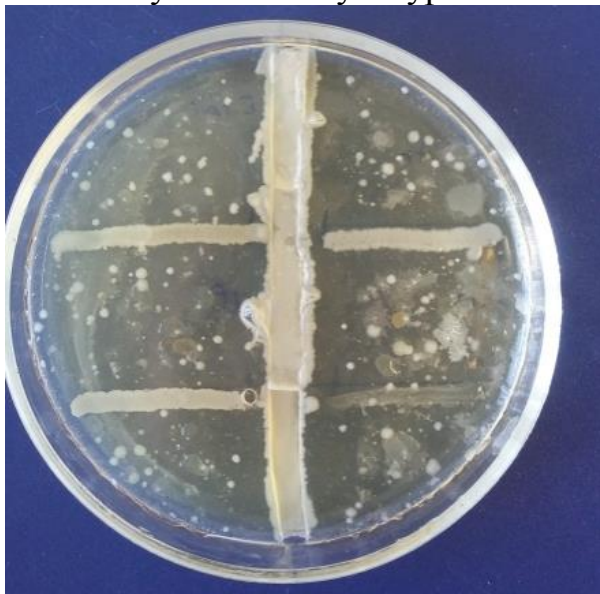


Рисунок 48 – Культура Л10

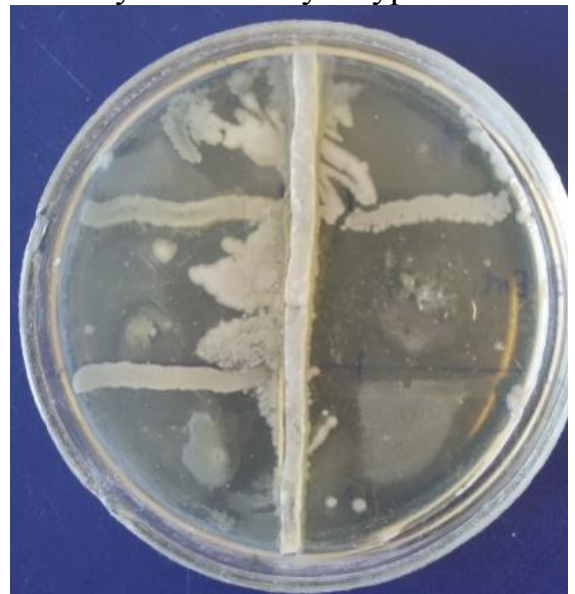


Рисунок 49 – Культура Л11

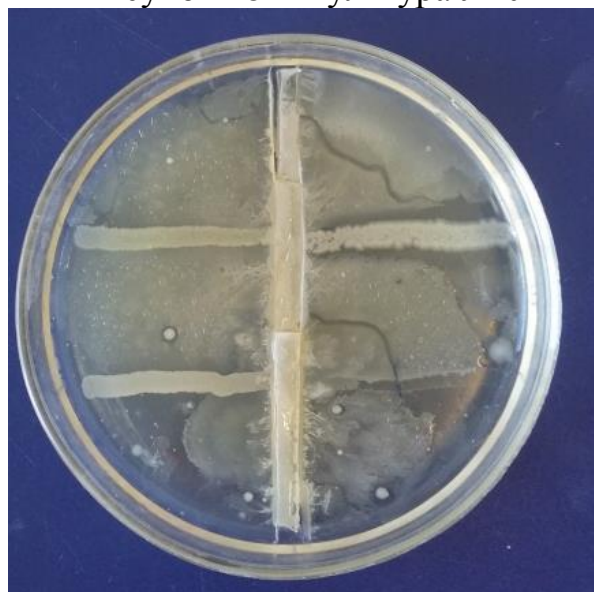


Рисунок 50 – Культура Л25

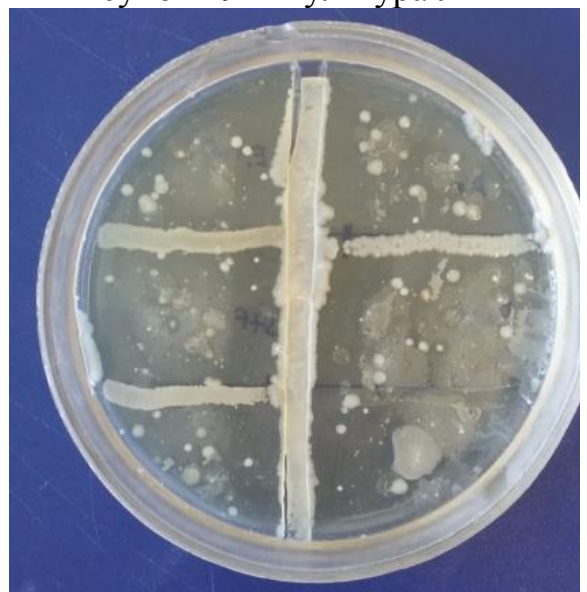


Рисунок 51 – Культура Л26

Зона задержки роста культуры *Staphylococcus aureus* при проверке антагонистической активности контрольного микроорганизма *Lactobacillus plantarum*, выделенного из Лактобактерина, составила 4 мм. По влиянию на *Staphylococcus aureus* из тестируемых культур лидировала культура Л4: отмечалось отсутствие роста культуры 25 мм (больше на 525% по сравнению с контролем, статистически значимо). Слабое (меньшее) антагонистическое действие по сравнению с контролем показали культуры Л6, Л7, Л10 и Л11, зона задержки роста составила 5 мм (выше на 25%,  $p < 0,01$ ), 3 мм (меньше на 25%,  $p < 0,01$ ), 7 мм (выше на 75%,  $p < 0,01$ ) и 6 мм (выше на 50%,  $p < 0,01$ ) соответственно. Вследствие того, что у культур Л5, Л8, Л9 и Л25 антагонистическая активность по отношению к *Staphylococcus aureus* была равной контрольному образцу (различия статистически не значимы).

Зона задержки роста культуры *Escherichia coli* при проверке антагонистической активности контрольного микроорганизма *Lactobacillus plantarum*, выделенного из Лактобактерина, составила 6 мм. По влиянию на *Escherichia coli* из тестируемых культур лидировала культура Л11: отмечалось отсутствие роста культуры 12 мм (больше на 100% по сравнению с контролем,  $p < 0,01$ ). Культура Л4 и Л10 также обладают высокой активностью в отношении кишечной палочки, зона задержки роста составила 10 мм (больше на 66% по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ). Культура Л8 и Л9 давали зону задержки роста 9 мм (больше на 50%), культуры Л5 8 мм (выше на 33%), У образца Л7 зона задержки роста составила 7 мм (больше на 16% по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ) Образец Л6 показал результат ниже контроля т.е. не подавляет рост, решено исключить ее из дальнейшего статистического анализа.

Зона задержки роста культуры *Pseudomonas aeruginosa* при проверке антагонистической активности контрольного микроорганизма *Lactobacillus plantarum*, выделенного из Лактобактерина, составила 4 мм. Выделенные из клинического материала. Следует отметить *Lactobacillus spp.*, проявляли

антагонистическую активность по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* из значительно большую по сравнению с контрольным образцом – производственного штамма из пробиотика. Из тестируемых культур лидировала культура Л25: отмечалось отсутствие роста культуры 24 мм (больше на 500% по сравнению с контролем,  $p < 0,01$ ). Культура Л9 также обладает высокой активностью в отношении кишечной палочки, зона задержки роста составила 19 мм (больше на 375% по сравнению с контролем, статистически значимо). Культура Л4 давала зону задержки роста 16 мм (больше на 300%), культура Л8 немного уступила в показателях 15мм (275%). Слабое (меньшее) антагонистическое действие по сравнению с контролем показали культуры Л6, Л11, и Л5, зона задержки роста составила 14 мм (выше на 250%,  $p < 0,01$ ), 12мм (выше на 200%,  $p < 0,01$ ), 9мм (выше на 125%,  $p < 0,01$ ) соответственно. Культуры Л7 и Л10 показали одинаковый результат по 8мм задержки роста, что дало им по 100% преимущество над контролем.

Зона задержки роста культуры *Enterococcus faecium* при проверке антагонистической активности контрольного микроорганизма *Lactobacillus plantarum*, выделенного из Лактобактерин,, составила 3 мм. При оценке действия *Lactobacillus spp.* с большим отрывом лидировала культура Л7 12мм (300%  $p < 0,01$ ). Культуры Л6 и Л10 также обладали высокой активностью 7мм (133%  $p < 0,01$ ), культуры Л4 и Л9 показали одинаковый результат по 8мм задержки роста, что дало им по 100% преимущество над контролем ( $p < 0,05$ ). У представленных культур Л5, Л8 и Л11 отмечалось отсутствие роста культуры 5 мм (больше на 166% по сравнению с контролем,  $p < 0,01$ ). Образец Л25 был равен контрольному образцу (различия статистически не значимы).

По результатам ранговой статистики, наиболее выраженным антагонистическим действием обладали культуры Л4, Л9 Л11 Л10, Л8, Л25, Л6, и Л7. Слабое антагонистическое действие по сравнению с контрольным препаратом показала культура Л5 (таблица 17).

Однако, культура Л6 по одному пункту обладает меньшей активностью по сравнению с контролем. Культура Л7 обладают значительно меньшей активностью по отношению к *Staphylococcus aureus* в сравнении с контролем, что является важным недостатком. В связи с этим, для повышенной антагонистической активности по отношению ко всем условно-патогенным микроорганизмам рекомендуется использовать консорциум *Lactobacillus spp.* из культур Л4, Л5, Л8, Л9, Л10, Л11, Л25.

Таблица 17 – Результаты антагонистической активности

№	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Enterococcus faecium</i>			Сумма рангов
	Зона задержки роста, мм	Разница с контролем, %	Ранг	Зона задержки роста, мм	Разница с контролем, %	Ранг	Зона задержки роста, мм	Разница с контролем, %	Ранг	Зона задержки роста, мм	Разница с контролем, %	Ранг	
Л4	10	↑ на 66% **	2	25	↑ на 525% **	1	16	↑ на 300% **	3	6	↑ на 100% **	3	9
Л5	8	↑ на 33% *	4	4	=	5	9	↑ на 125% **	7	5	↑ на 66% **	4	20
Л6	5	↓ на 16%	7	5	↑ на 25% *	4	14	↑ на 250% **	5	7	↑ на 133% **	2	18
Л7	7	↑ на 16%	5	3	↓ на 25%	4	8	↑ на 100% **	8	12	↑ на 300% **	1	18
Л8	9	↑ на 50% **	3	4	=	5	15	↑ на 275% **	4	5	↑ на 66% **	4	16
Л9	9	↑ на 50% **	3	4	=	5	19	↑ на 375% **	2	6	↑ на 100% **	3	13
Л10	10	↑ на 16%	2	7	↑ на 75% **	2	8	↑ на 100% **	8	7	↑ на 133% **	2	14
Л11	12	↑ на 100% **	1	6	↑ на 50% **	3	12	↑ на 200% **	6	5	↑ на 66% **	4	14
Л25	7	↑ на 16%	5	4	=	5	24	↑ на 500% **	1	3	=	5	16
Л26	6		6	4		5	4		9	3		5	25

Примечание: \* - статистически значимая разница  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (Л26); \*\* - статистически значимая разница  $p < 0,01$  по сравнению с контролем (Л26).

### 3.11. Идентификация исследуемых образцов до вида

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, деионизированную воду, кроме праймеров и зондов.

Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом в 25 мкл, содержащей 3 мкл исследуемого образца ДНК, 10 мкл 2,5× ПЦР-микс, по 1 мкл прямого и обратного праймера, 10 мкл  $ddH_2O$ .

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.

Подготовили и расставили в штативе 10 пробирок с выделенной ДНК, 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I,  $ddH_2O$ , растворы пары видоспецифичных праймеров *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. crispatus*. Положительный контрольный образец (ПКО) с ДНК лактобактерий, ПКО с ДНК лактобактерий для разморозки.

В штатив подготовили стерильную пробирки объемом 1,5 мл.

В пробирке приготовили общую реакционную смесь для лактобактерий (с расчетом на 12 пробирок): добавили 300 мкл  $ddH_2O$ , 300 мкл 2,5х-ной реакционной смеси SYBR Green I, по 30 мкл каждого праймера из пары родоспецифичных *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. crispatus*.

Тщательно перемешали на вортексе.



Отобрали пинцетом 12 одноразовых стерильных полипропиленовых пробирок объемом 0,2 мл и расставили в штатив соответствующим образом.

В 11 подготовленные пробирки внесли по 22 мкл общую реакционную смесь для пары родоспецифичных *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. crispatus*, используя наконечник с фильтром.

В каждую пробирку внесли по 3 мкл ДНК исследуемого образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром, по порядку с 1 по 11, затем в следующие пробирки внесли ПКО лактобактерии (ПКЛ), в качестве отрицательного контроля в последних пробирках использовали 3 мкл ddH<sub>2</sub>O.

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

На приборе создать эксперимент с соответствующими параметрами плашки: размер, тип, режим сканирования, флуорофор, названия проб; указали объем реакционной смеси в одной пробирке. Затем запустили программу с параметрами.

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

Таким образом, чистая культура, закодированная Л4, относится к роду *Lactobacillus* и виду *L. crispatus*, культура Л5 – *L. fermentum*, две культуры Л6 и Л8 – *L. rhamnosus*, две культуры Л7 и Л10 – *L. plantarum*, три культуры Л9, Л11 и Л25 – *L. acidophilus*.

Чистая культура, выделенная из пробиотика Лактобактерин, относится к виду *L. plantarum*, что подтвердилось результатами амплификации (таблица 18).

Таблица 18 – Результаты амплификации

A	4 <i>L. acidophilus</i> отриц ательн ый	5 <i>L. acidophilus</i> отриц ательн ый	6 <i>L. acidophilus</i> отриц ательн ый	7 <i>L. acidophilus</i> отриц ательн ый	8 <i>L. acidophilus</i> отриц ательн ый	9 <i>L. acidophilus</i> полож итель ный	10 <i>L. acidophilus</i> отриц ательн ый	11 <i>L. acidophilus</i> полож итель ный	25 <i>L. acidophilus</i> полож итель ный	26 <i>L. acidophilus</i> отриц ательн ый	ОКО <i>L. acidophilus</i> отриц атель ный	
B	4 <i>L. brevis</i> отриц ательн ый	5 <i>L. brevis</i> отриц ательн ый	6 <i>L. brevis</i> отриц ательн ый	7 <i>L. brevis</i> отриц ательн ый	8 <i>L. brevis</i> отриц ательн ый	9 <i>L. brevis</i> отриц ательн ый	10 <i>L. brevis</i> отриц ательн ый	11 <i>L. brevis</i> отриц ательн ый	25 <i>L. brevis</i> отриц ательн ый	26 <i>L. brevis</i> отриц ательн ый	ОКО <i>L. brevis</i> отриц атель ный	
C	4 <i>L. casei</i> отриц ательн ый	5 <i>L. casei</i> отриц ательн ый	6 <i>L. casei</i> отриц ательн ый	7 <i>L. casei</i> отриц ательн ый	8 <i>L. casei</i> отриц ательн ый	9 <i>L. casei</i> отриц ательн ый	10 <i>L. casei</i> отриц ательн ый	11 <i>L. casei</i> отриц ательн ый	25 <i>L. casei</i> отриц ательн ый	26 <i>L. casei</i> отриц ательн ый	ОКО <i>L. casei</i> отриц атель ный	
D	4 <i>L. delbrueckii</i> отриц ательн ый	5 <i>L. delbrueckii</i> отриц ательн ый	6 <i>L. delbrueckii</i> отриц ательн ый	7 <i>L. delbrueckii</i> отриц ательн ый	8 <i>L. delbrueckii</i> отриц ательн ый	9 <i>L. delbrueckii</i> отриц ательн ый	10 <i>L. delbrueckii</i> отриц ательн ый	11 <i>L. delbrueckii</i> отриц ательн ый	25 <i>L. delbrueckii</i> отриц ательн ый	26 <i>L. delbrueckii</i> отриц ательн ый	ОКО <i>L. delbrueckii</i> отриц атель ный	
E	4 <i>L. fermentum</i> отриц ательн ый	5 <i>L. fermentum</i> полож итель ный	6 <i>L. fermentum</i> отриц ательн ый	7 <i>L. fermentum</i> отриц ательн ый	8 <i>L. fermentum</i> отриц ательн ый	9 <i>L. fermentum</i> отриц ательн ый	10 <i>L. fermentum</i> отриц ательн ый	11 <i>L. fermentum</i> отриц ательн ый	25 <i>L. fermentum</i> отриц ательн ый	26 <i>L. fermentum</i> отриц ательн ый	ОКО <i>L. fermentum</i> отриц атель ный	
F	4 <i>L. plantarum</i> отриц ательн ый	5 <i>L. plantarum</i> отриц ательн ый	6 <i>L. plantarum</i> отриц ательн ый	7 <i>L. plantarum</i> полож итель ный	8 <i>L. plantarum</i> отриц ательн ый	9 <i>L. plantarum</i> отриц ательн ый	10 <i>L. plantarum</i> полож итель ный	11 <i>L. plantarum</i> отриц ательн ый	25 <i>L. plantarum</i> отриц ательн ый	26 <i>L. plantarum</i> полож итель ный	ОКО <i>L. plantarum</i> отриц атель ный	
G	4 <i>L. rhamnosus</i> отриц ательн ый	5 <i>L. rhamnosus</i> отриц ательн ый	6 <i>L. rhamnosus</i> полож итель ный	7 <i>L. rhamnosus</i> отриц ательн ый	8 <i>L. rhamnosus</i> полож итель ный	9 <i>L. rhamnosus</i> отриц ательн ый	10 <i>L. rhamnosus</i> отриц ательн ый	11 <i>L. rhamnosus</i> отриц ательн ый	25 <i>L. rhamnosus</i> отриц ательн ый	26 <i>L. rhamnosus</i> отриц ательн ый	ОКО <i>L. rhamnosus</i> отриц атель ный	
H	4 <i>L. crispatus</i> полож итель ный	5 <i>L. crispatus</i> отриц ательн ый	6 <i>L. crispatus</i> отриц ательн ый	7 <i>L. crispatus</i> отриц ательн ый	8 <i>L. crispatus</i> отриц ательн ый	9 <i>L. crispatus</i> отриц ательн ый	10 <i>L. crispatus</i> отриц ательн ый	11 <i>L. crispatus</i> отриц ательн ый	25 <i>L. crispatus</i> отриц ательн ый	26 <i>L. crispatus</i> отриц ательн ый	ОКО <i>L. crispatus</i> отриц атель ный	

Для удобства оформления выводов, нами была выведена числовая характеристика обще видового показателя задержки роста. Это некоторое число, заключённое между наименьшим и наибольшим из их значений (таблица 19).

Таблица 19 – Среднее значение антагонистической активности для каждого вида

№	Культура	Вид	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus</i>
1	Л4	<i>L. crispatus</i>	10	25	16	6
2	Л5	<i>L. fermentum</i>	8	4	9	5
3	Л6 Л8	<i>L. rhamnosus</i>	7	4,5	14,5	6
4	Л7 Л10 Л26	<i>L. plantarum</i>	7,6	4,6	6,6	7,3
5	Л9 Л11 Л25	<i>L. acidophilus</i>	9,3	4,6	18,3	4,6

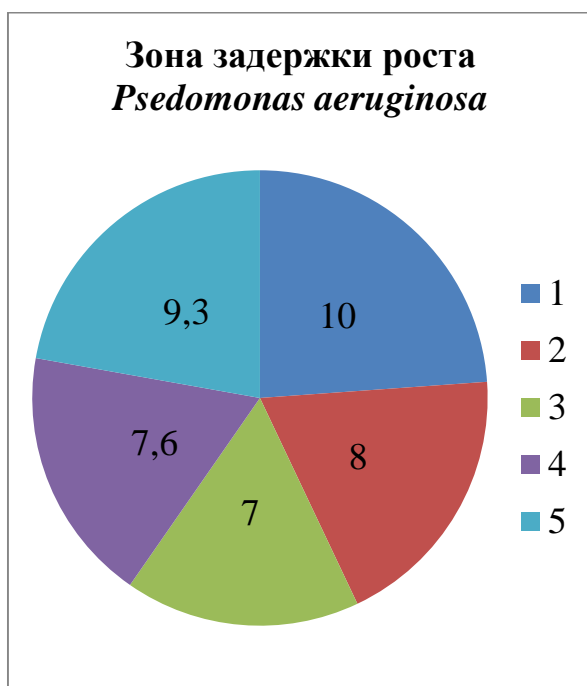


Рисунок 52 – Среднее значение  
зоны задержки роста  
*Pseudomonas aeruginosa*



Рисунок 53 - Среднее значение  
зоны задержки роста  
*Escherichia coli*

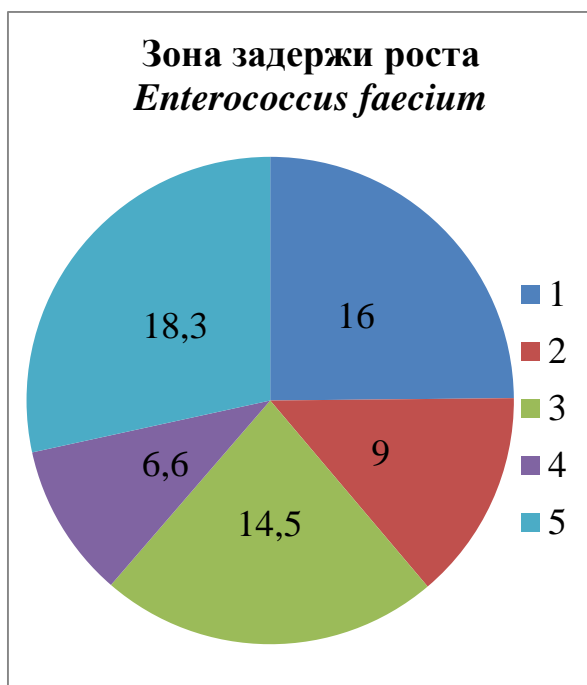


Рисунок 54 – Среднее значение  
зоны задержки роста  
*Enterococcus faecium*

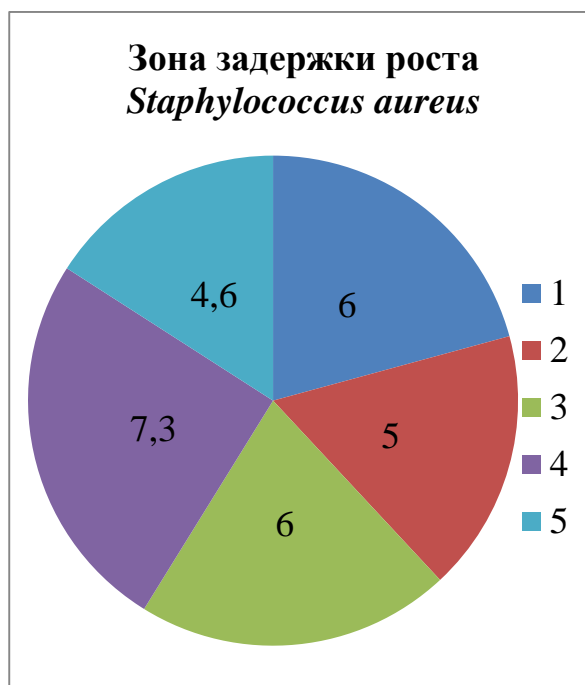


Рисунок 55 - Среднее значение  
зоны задержки роста  
*Staphylococcus aureus*

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Организм человека является открытой системой, обладающей способностью поддерживать комплексное постоянство своего состава и свойств внутренней среды. Сохранять устойчивость основных физиологических функций живого организма удастся посредством скоординированных реакций, направленных на поддержание динамического равновесия. Одной из частей этого гомеостаза представляет собой микрофлора, состоящая из множества микробиоценозов, характеризующихся определенным составом и занимающих соответствующее место в организме человека. Нормальная микрофлора кишечника и влагалища на 99% состоит из анаэробных видов бактерий. Господствующее место принадлежит представителям семейства *Lactobacillaceae*. Каждый локус человеческого организма отличается количественным и качественным составом микроорганизмов, это является гарантом здоровья человека. Даже незначительное изменение какого-либо звена микрофлоры, зачастую сопровождается и нарушениями соответствующих функций, что может привести к заболеванию.

Нарушение биологического равновесия между патогенной и физиологической микрофлорой, в медицинской практике принято называть: дисбактериозом, дисбиозом, микробиологическим дисбалансом или дисбиотическим состоянием. Терминология этих определений весьма обширна, однако неизменным остается то, что это вторичные состояния, характеризующееся как местными, так и общими нарушениями, которые способствуют более тяжелому течению основного заболевания.

Несмотря на то, что для характеристики биотопов с высокой степенью обсемененности используются различные методы, эталоном остается бактериологический анализ. Но при этом не стоит забывать, что ручная стандартная фенотипическая идентификация бактерий сложна и не соответствует современным потребностям клинической лаборатории.

Современные реалии подчеркивают необходимость, применения молекулярных методов идентификации представителей рода *Lactobacillus*. До начала таксономических исследований необходимо выделить чистую культуру. Данный процесс является трудоемким, продолжительным по времени, несет в себе высокие коммерческие издержки.

Разработка новых способов культивирования культур рода *Lactobacillus* позволит сократить время и затраты на преданалитическом этапе. Перспективной представляется селекция аутоштамов при помощи бактериофагов, как фактора, способствующего наилучшему развитию лактобацилл.

Полученные в данной работе результаты подчеркивают эффективность использования фагов в качестве селективных агентов.

В ходе экспериментальной работы при использовании бактериофагов проведено выделение чистых культур микроорганизмов из накопительных культур на плотной питательной среде и выделение чистых культур *Lactobacillus spp.* из накопительных культур в жидкой питательной среде. Методом ПЦР в режиме реального времени была определена принадлежность культур к роду *Lactobacillus* а также их видовое положение.

Одной из главных задач было получение антагонистически активных штаммов рода *Lactobacillus*. Для оценки антагонистической активности использовались микроорганизмы с положительным результатом ПЦР на принадлежности к роду *Lactobacillus*. Метод перпендикулярных штрихов позволил проверить антагонистическую активность конкретных представителей рода *Lactobacillus*.

В ходе проведения работы создана коллекция клинических штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, обладающих высокой антагонистической активностью

Практический выход данной работы заключался в разработке методологии использования бактериофага в качестве селективного агента при культивировании рода *Lactobacillus*.

## ВЫВОДЫ

1. Из клинического материала и пробиотиков, наиболее часто используемых для лечения БВ, выделены чистые культуры штаммов бактерий рода *Lactobacillus*. Выполнено таксономическое определение полученных культур.
2. Проведена оценка антагонистической активности выделенных бактерий рода *Lactobacillus* к условно-патогенным микроорганизмам. Методом отсроченного антагонизма показано, что культуры *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* подавляют рост условно-патогенных микроорганизмов родов *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Candida*, при этом *Lactobacillus crispatus* проявляет более выраженную антагонистическую активность.
3. Результаты исследований свидетельствуют о перспективности использования штамма *Lactobacillus crispatus* для создания нового пробиотика с повышенной антагонистической активностью для профилактики и лечения бактериального вагиноза.
4. Разработана методика ускоренного получения чистых культур представителей рода *Lactobacillus* с последующим созданием коллекции кандидатов в пробиотики.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев А.А.и др., Учебник «Медицинская вирусология и иммунология». 2006 Москва МИА ст. 437-440
2. Беляева Екатерина Андреевна Микробиота кишечника коренного жителя Центрального федерального округа РФ как основа для создания региональных пробиотических препаратов 03.02.03 – микробиология Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук Научный руководитель: доктор медицинских наук, доцент Ю.В. Червинец
3. МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В.ЛОМОНОСОВА Биологический факультет Кафедра микробиологии На правах рукописи Харченко Наталья Васильевна  
ВЫДЕЛЕНИЕ БИФИДОБАКТЕРИЙ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ  
Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук 03.02.03 – микробиология Научный руководитель: д.б.н., проф. Нетрусов Александр Иванович Москва 2016
4. Бондаренко, В.М. Дисбактериоз кишечника как клинко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы / В.М. Бондаренко, Т.В. Мацу-левич. - М.: ГЭОТАР–Медиа, - 2007. - С. 8 - 35
5. Блинкова, Л.П. Бактериоцины: критерии, классификация, методы выявления / Л.П. Блинкова // Журн. микробиол. - 2003. - № 3. - С. 109 - 113.
6. Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовский И.А. Выживаемость микроорганизмов в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека. / Кишечная микрофлора. 2013. № 2. С. 4-8.
7. Дворников В.М. Технология сохранения жидких концентратов бифидобактерий и лактобацилл на основе стабилизированной

активированной низкоминерализованной воды в метастабильном состоянии. / Ижевск: «Мир – РТ». 2005. № 37. С. 5.

8. Демаков В.А., Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю. Иммобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты. / Биотехнология. 2008. №2. С. 30-45.

9. Мечников И.И. Этюды Оптимизма. / М.: Наука. 1988. 328 с.

10. Пиксасова О.В. Новый подход к молекулярной диагностике бифидобактерий. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. М.: МГУ имени М.В.Ломоносова. 2009. 23

11. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология: некоторые итоги и перспективы исследований. / Вестник РАМН. 2005. №12. С. 13-17.

12. Шендеров Б.А., Минушкин О.Н., Елизаветина Г.А., Ардатская М.Д. Нарушение баланса микрофлоры и ее коррекция. / Эффективная фармакокинетика. 2013. № 41. С. 4-8.

13. Сергей Головин Бактериофаги: убийцы в роли спасителей // Наука и жизнь. — 2017. — № 6. — С. 26-33

14. Мавзютов А.Р. с соавт., 2002

15. Фирсов словарь микробиологических терминов. - Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 185 с.

16. Гудков : технологические, биологические и физико-химические аспекты. М.: ДеЛи принт, 2003, 800 с.

17. Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот Тихоненко Т.И., 1962

18. Anderson K., Johansson A., Sheehan T., Mott B., Corby-Harris V. Draft genome sequences of two Bifidobacterium sp. from the honey bee (Apis mellifera). / Gut Pathogen. 2013. V. 5. P. 1-3.

19. Barrett E., Ross R., Fitzgerald G., Stanton C. Rapid screening method for analysing the conjugated linoleic acid production capabilities of bacterial cultures

20. Cleveland J, Montville T, Nes I. Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. / *Int. J. Food Microbiol.* 2001. V. 71.
21. Lin Y-G, Meijer G., Vermeer M., Trautwein E. Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. / *J. Nutr.* 2004. V. 134. P. 143-148
22. Steven A. Frese, Andra A. Hutton, Lindsey N. Contreras, Claire A. Shaw, Michelle C. Palumbo, Giorgio Casaburi, Gege Xu, Jasmine C. C. Davis, Carlito B. Lebrilla, Bethany M. Henrick, Samara L. Freeman, Daniela Barile, J. Bruce German, David A. Mills, Jennifer T. Smilowitz, Mark A. Underwood. Persistence of Supplemented *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* EVC001 in Breastfed Infants. *mSphere*, 2017; 2 (6): e00501-17 DOI:10.1128/mSphere.00501-17
23. Steven A. Frese, Andra A. Hutton, Lindsey N. Contreras, Claire A. Shaw, Michelle C. Palumbo, Giorgio Casaburi, Gege Xu, Jasmine C. C. Davis, Carlito B. Lebrilla, Bethany M. Henrick, Samara L. Freeman, Daniela Barile, J. Bruce German, David A. Mills, Jennifer T. Smilowitz, Mark A. Underwood. Persistence of Supplemented *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* EVC001 in Breastfed Infants. *mSphere*, 2017; 2 (6): e00501-17 DOI:10.1128/mSphere.00501-17
24. M. Colomer-Lluch, L.Imamamovic, J. Jofre, and M. Muniesa, 2011. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antim. Agents Chemother.* 55:4908-4911.
25. Woodman, C.B. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study / C.B. Woodman, S. Collins, H. Winter, A. Bailey, J. Ellis, P. Prior // *Lancet.* - 2001. - № 357. - P. 1831 - 1836.
26. Chen, C.C. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states / C. C. Chen, W.A. Walker // *Adv. Pediatr.* - 2005. - № 52. - P. 77 - 113.
27. .Petrof, E.O. Probiotics inhibit nuclear factor-kappa B and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition / E.O.

Petrof, K. Kojima, M.J. Ropeleski, M.W. Musch, Y. Tao, C. De Simone, E.B. Chang. // *Gastroenterology*. - 2004. - № 127. - P. 1474 - 1487.

28. .Rojas, M. Colonization by lactobacilli of piglet small intestinal mucus / M. Rojas, P.L. Conway // *J. Appl. Bact.* - 1996. - № 81. - P. 474-480.

29. Sallivan, A. Probiotics in human infections / A. Sullivan, C.E. Nord // *Int. J. Antimicrob Chemother.* - 2002. - № 50. - P. 625 - 7.

30. Zamfir, M. Production kinetics of acidophilin 801, a baeteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 / M. Zamfir, R. Callewaert, P.C. Cornea, L. De Vuyst // *FEMS Microbiol. Lett.* - 2000. - № 190. - P. 305 - 308.

31. Способ получения съедобного биологически активного полуфабриката и съедобный биологически активный полуфабрикат, полученный этим способом Борисенко Е.Г.

32. Сергей Головин Бактериофаги: убийцы в роли спасителей // Наука и жизнь. — 2017. — № 6. — С. 26-33

33. Ackermann H.-W. // *Res. Microbiol.*, 2003. — V. 154. — P. 245—251.

34. Ожерельева Н. Г. Краткая Медицинская Энциклопедия, М.: изд-во «Советская Энциклопедия», 1989. — издание второе.

35. ↑ Guliy O.I., Bunin V.D., O'Neil D., Ivnitski D., Ignatov O.V. A new electro-optical approach to rapid assay of cell viability // *Biosensors and Bioelectronics*. 2007. V. 23. P. 583—587.

36. Аутосерологические исследования при кишечных заболеваниях детей младших возрастов и назначение рациональной антимикробной терапии /Н.Н. ЗининБермес, Л.П. Осипова, В.А. Громова и др. //Мать и Дитя в Кузбассе. – 2004. – № 3. – С. 2021.

37. Практикум по микробиологии под редакцией «Academa», 2005, 603с.

38. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents.

39. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2003; 2: 114-22.

40. Datcu R. Characterization of the vaginal microflora in health and disease. *Dan Med J*. 2014 Apr;61(4):B4830.
41. De Backer E., Dubreuil L., Brauman M., Acar J., Vaneechoutte M. In vitro activity of secnidazole against *Atopobium vaginae*, an anaerobic pathogen involved in bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect* 2010.16:470–2.
42. Devillard E., Burton J.P., Hammond J.A., Lam D., Reid G. DiGiulio D.B., Romero R., Kusanovic J.P., Gomez R., Kim C.J., Seok K.S., et al. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 2010. 64:38–57.
43. Doerflinger S.Y., Throop A.L., Herbst-Kralovetz M.M. Bacteria in the Vaginal Microbiome Alter the Innate Immune Response and Barrier Properties of the Human Vaginal Epithelia in a Species-Specific Manner. *J Infect Dis*. 2014 Feb
44. Eckert L.O. Acute vulvovaginitis. *N. Engl. J. Med*. 2006 355:1244 - 1252
45. Eschenlauer S.C., McKain N., Walker N. D., McEwan N. R., Newbold C. J., and Wallace R. J. Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration, isolation, and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen. *Appl. Environ. Microbiol*. 2002.68:4925–4931.
46. Eribe ER, Paster BJ, Caugant DA, Dewhirst FE, Stromberg VK, Lacy GH, Olsen I. Genetic diversity of *Leptotrichia* and description of *Leptotrichia goodfellowii* sp. nov., *Leptotrichia hofstadii* sp. nov., *Leptotrichia shahii* sp. nov. and *Leptotrichia wadei* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54(Pt 2):583–592.
47. Farage M., Miller K., Sober J. Dynamics of the vaginal ecosystem - Hormonal influences. *Infect. Diseases: Research and Treatment*, 2010, 3, 1-15.
48. Ferris M.J., Masztal A., Aldridge K.E., Fortenberry J.D., Fidel P.L. Jr, Martin D.H. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described

metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. BMC Infect Dis.

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

50. Forestier, C. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties / C. Forestier, C. De Champs, C. Vatoux, B. Joly // Res. Microbiol. - 2001 - № 152 - P. 167 - 173

51. Geidorfer W., Bohmer C., Pelz K., Schoerner C., Frobenius W., and Bogdan C. Tuboovarian abscess caused by *Atopobium vaginae* following transvaginal oocyte recovery. J. Clin. Microbiol. 2003.41:2788–2790.

52. Gardiner G., Heinemann-Gijzen C., Madrenas J. et al. Oral administration of the probiotic combination *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L.reuteri* RC-14 for human intestinal applications. Int Dairy J 2002; 12:2/3: 191-196.

53. Han Y.W., Shen T., Chung P., Buhimschi I.A., Buhimschi C.S. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. J ClinMicrobiol. 2009 Jan. 47(1):38-47.

54. Hillier S.L., Kiviat N.B., Hawes S.E., et al. Role of bacterial vaginosis-associated microorganisms in endometritis. Am J ObstetGynecol 1996 175:435-441.

55. Hillier S. Normal vaginal flora. In: Holmes K., Sparling P., Stamm V. et al. editors. Sexually transmitted diseases. 4th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2008, p.289-307.

56. Hütt, P. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens / P. Hütt, J. Shchepetova, K. Lõivukene, T. Kullisaar, M..Mikelsaar // J Appl Microbiol. - 2006 - № 100 (6). - P. 1324 - 32

57. Kaul R., Nagelkerke N.J., Kimani J., Ngugi E., Bwayo J.J., Macdonald K.S., et al. Prevalent herpes simplex virus type 2 infection is associated with

altered vaginal flora and an increased susceptibility to multiple sexually transmitted infections. *J Infect Dis* 2007 196: 1692–7.

58. Kazar C.E., Mitchell P.M., Lee A.M., Stokes L.N., Loesche W.J., Dewhirst F.E., et al. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol* 2003. 41:558–63.

## ПРИЛОЖЕНИЕ



(72) <b>АВТОР</b> Фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии)	Адрес места жительства, включающий официальное наименование страны и ее код	
<b>МАВЗЮТОВ АЙРАТ РАДИКОВИЧ</b> <b>ЦВЕТКОВА АНЖЕЛА ВЛАДИМИРОВНА</b> <b>МАРКУШЕВА ТАТЬЯНА ВЯЧЕСЛАВОВНА,</b> <b>ДЕНИСОВ ДМИТРИЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ</b> <b>БАЙМИЕВ АНДРЕЙ ХАНИФОВИЧ</b> <b>ХЛОПОВА КСЕНИЯ ВАЛЕРЬЕВНА</b> <b>ДИНОВА РЕГИНА КАМИЛЕВНА</b>	Российская Федерация, RU, 450077, г. Уфа, ул. Чернышевского, д. 104, кв. 41	Российская Федерация, RU, Республика Башкортостан, 453211, г. Ишимбай, ул. Докучаева, д. 2, кв. 87
	Российская Федерация, RU, 450006, г. Уфа, ул. бульвар Ибрагимов, д. 19, кв. 113	Российская Федерация, RU, 450044, г. Уфа, ул. Калинина, д. 2, кв. 24
	Российская Федерация, RU, 450059, г. Уфа, ул. Братьев Кадомцевых, д. 1, кв. 5	Российская Федерация, RU, 450076, г. Уфа, ул. Малая Ахтынская, д. 32а
	Российская Федерация, RU, 628464, ХМАО-Югра, Тюменская область, г. Радужный, 1 мкр., 46-122	
<input type="checkbox"/> Я (мы) _____ (фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии))  <b>Прошу (просим) не упоминать меня (нас) как автора(ов) при публикации сведений</b> <input type="checkbox"/> о заявке <input type="checkbox"/> о выдаче патента Подпись(и) автора(ов)  <input type="checkbox"/> Просьба автора(ов) не упоминать его (их) при публикации прилагается (отмечается при подаче заявки в электронном виде)		
<b>ПЕРЕЧЕНЬ ПРИЛАГАЕМЫХ ДОКУМЕНТОВ</b>		Количество листов в 1 экз.      Количество экземпляров
<input checked="" type="checkbox"/> описание изобретения	10	2
<input type="checkbox"/> перечень последовательностей		
<input checked="" type="checkbox"/> формула изобретения (количество пунктов формулы <u>1</u> ) (указать)	1	2
<input checked="" type="checkbox"/> чертеж(и) и иные материалы фигуры чертежей, предлагаемые для публикации с рефератом _____ (указать)	4	2
<input checked="" type="checkbox"/> реферат	1	2
<input checked="" type="checkbox"/> копия документа, подтверждающего уплату патентной пошлины (пошлин), (представляется по собственной инициативе заявителя)	1	1
<input checked="" type="checkbox"/> ходатайство о предоставлении права на освобождение от уплаты патентной пошлины или на уплату этой пошлины в уменьшенном размере	11	1
<input type="checkbox"/> копия первой заявки (при испрашивании конвенционного приоритета)		
<input type="checkbox"/> перевод заявки на русский язык		
<input type="checkbox"/> доверенность		
<input type="checkbox"/> согласие представителя заявителя на обработку его персональных данных		
<input type="checkbox"/> просьба автора(ов) не упоминать его (их) при публикации		
<input type="checkbox"/> другой документ _____ (указать наименование документа)		

**Федеральная служба по интеллектуальной собственности  
Федеральное государственное бюджетное учреждение**

**«Федеральный институт промышленной собственности»  
(ФИПС)**

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

**УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ**

<b>17.04.2018</b>	<b>022181</b>	<b>2018114180</b>
<i>Дата поступления</i>	<i>Входящий №</i>	<i>Регистрационный №</i>

<b>ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ</b> <small>(дата регистрации заявки)</small> <b>17 АПР 2018</b>		<b>(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №</b> <b>022181</b>	<b>ВХОДЯЩИЙ №</b> <b>2018114180</b>
<b>(85) ДАТА ПЕРЕВОДА</b> международной заявки на национальную фазу			
<input type="checkbox"/> (86) <b>ФИПС ОТДАТ</b> <small>(интернациональный номер международной заявки и дата международной подачи, установленные международными соглашениями)</small> <input type="checkbox"/> (87) <small>(номер и дата международной публикации международной заявки)</small> <input type="checkbox"/> (96) <small>(номер европейской заявки и дата ее подачи)</small> <input type="checkbox"/> (97) <small>(номер и дата публикации европейской заявки)</small>		<b>АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ</b> <small>(почтовый адрес, фамилия и инициалы или наименование адресователя)</small> ЛЕНИНА, 3, УФА, 450008. БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ. ПАТЕНТНЫЙ ОТДЕЛ. Телефон: (347) 272-42-22 Факс: 272-37-51 Адрес электронной почты: <b>АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ</b> <small>(заполняется при подаче заявки на секретное изобретение)</small>	
<b>ЗАЯВЛЕНИЕ</b> о выдаче патента Российской Федерации на изобретение		В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация	
<b>(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ</b> <b>СПОСОБ СЕЛЕКТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ АУТОШТАММОВ</b> <b>LACTOBACILLUS SPP.</b> <b>ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА</b>			
<b>(71) ЗАЯВИТЕЛЬ</b> (фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) физического лица или наименование юридического лица (согласно учредительному документу); место жительства или место нахождения, название страны в почтовом индексе) Общество с ограниченной ответственностью Торговый дом "ЭкоФарм сервис" Российская Федерация, 450029, г. Уфа, ул. Ульяновых, 65 <input type="checkbox"/> Изобретение создано за счет средств федерального бюджета Заявитель является: <input type="checkbox"/> государственным заказчиком <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком исполнителем работ (наименование) <input type="checkbox"/> исполнителем работ по: <input type="checkbox"/> государственному контракту <input type="checkbox"/> муниципальному контракту Заказчик работ (наименование) Контракт от №		<b>ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ</b> ОГРН 1120280012159 ИНН 0277120876 КПП 027701001  КОД СТРАНЫ (если он установлен) RU	
<b>(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ</b> (наименование фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) лица, назначенного заявителем своим представителем для ведения дел по изобретению патенты от его имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности или являющегося патентным агентом) Фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) Адрес Срок представительства (если в заявлении приложено доверенность представителя заявителя, срок должен не указываться)		<input type="checkbox"/> патентный поверенный <input type="checkbox"/> представитель по доверенности <input type="checkbox"/> представитель по закону Телефон: Факс: Адрес электронной почты: Регистрационный номер патентного поверенного	

ОТ 17  
19 АПР 2018  
240 60 15

*Реш*

52/1

Общее количество документов в листах	52	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)	0	Сергеева Н.Н.
Количество платежных документов	1	
Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются на сайте ФИПС по адресу « <a href="http://www.fips.ru">www.fips.ru</a> » в разделе «Информационные ресурсы / Открытые реестры»		

### ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Хлопова Ксения Валерьевна выполнила выпускную квалификационную работу на тему «СЕЛЕКЦИЯ АУТОШТАММОВ *LACTOBACILLUS SPP.* С ВЫРАЖЕННОЙ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БАКТЕРИОФАГОВ».

Практический выход данной работы заключается в разработке методологии использования бактериофага в качестве селективного агента при культивировании бактерий рода *Lactobacillus*. В ходе проведения работы удалось создать коллекцию клинических штаммов бактерий, обладающих высокой антагонистической активностью.

За время обучения в БГМУ Хлопова К.В. освоила учебную программу в полном объеме. Все годы училась только на «хорошо» и «отлично», с первого курса совмещая учебу с научной работой в молодежном научном кружке.

В процессе выполнения ВКР Хлопова К.В. успешно овладела основными молекулярно-биологическими и микробиологическими методами исследований. Полученные в ходе выполнения результаты апробированы и представлены в публикациях и в виде устных сообщений на конференциях (БГМУ 2016- 2018 гг., Ломоносов 2018 г.), результаты отмечены Дипломом за лучший доклад, данные оформлены в виде Патента РФ на изобретение.

В ходе выполнения ВКР Хлопова К.В. показала отличную способность выделять главное, акцентировать внимание на основных деталях исследований, формулировать собственную точку зрения по рассматриваемой проблеме, проявила навыки самостоятельной работы и компетенции, которыми должен обладать обучающийся по окончании учебы по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (профиль – микробиология).

Выпускная квалификационная работа Хлоповой Ксении Валерьевны ДОПУСКАЕТСЯ К ЗАЩИТЕ и рекомендуется для положительной оценки.

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



Т.В. Маркушева



### ОТЗЫВ

внешнего рецензента кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника УИБ УФИЦ РАН Актуганова Глеба Эдуардовича на выпускную квалификационную работу Хлоповой Ксении Валерьевны «СЕЛЕКЦИЯ АУТОШТАММОВ *LACTOBACILLUS SPP.* С ВЫРАЖЕННОЙ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БАКТЕРИОФАГОВ»

#### Актуальность темы исследования.

Лактобактерии (*Lactobacillus spp.*) являются представителями резидентной микрофлоры человека, в первую очередь полости рта, кишечника и влагалища. Изменение количественного и качественного состава лактобактерий является диагностическим признаком дисбактериоза. Вместе с тем лактобактерии имеют большое значение для пищевой промышленности, поскольку занимают ключевую позицию в производстве молочнокислых продуктов.

Важное место в выделении лактобактерий занимают питательные среды, в мировой микробиологической практике их насчитывают несколько десятков. Отмечено, что используемые на данный момент питательные среды часто не обладают необходимой селективностью для подавления роста сопутствующей бактериальной флоры.

Целью настоящей работы являлась разработка способа селективного выделения из клинического материала аутоштаммов рода *Lactobacillus* при использовании бактериофагов.

#### Теоретическая и практическая значимость работы.

Выделены перспективные штаммы лактобактерий, обладающие высокой антагонистической активностью, для дальнейшего конструирования пробиотических препаратов и использования их в медицине и пищевой промышленности.

Значение полученных результатов для практики подтверждается оформлением патента РФ на изобретение (справка о приоритете №2018114180 от 17.04.2018 г.).

#### Достоверность и апробация результатов исследования.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации, состоит в непосредственном участии во всех этапах процесса. ВКР является результатом самостоятельной работы автора от обоснования актуальности, постановки цели и задач исследования до проведения статистической обработки, анализа полученных данных и формулировки выводов. Достоверность результатов не вызывает сомнений, поскольку работа выполнена на достаточном клиническом материале с использованием микробиологических и молекулярно-генетических исследований. Достоверность результатов исследования подтверждается таблицами, рисунками и данными статистической обработки.

Основные положения работы доложены на Всероссийской молодежной научно-практической конференции «Региональные программы и проекты в области интеллектуальной собственности глазами молодежи» в рамках IX Международного форума «Интеллектуальная собственность – XXI век» (г. Уфа, 18 апреля 2016 г.); на 81-ой Всероссийской итоговой молодежной научной конференции с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины» (г. Уфа, 18-20 апреля 2016 г.); на XIX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (г. Санкт-Петербург, 23 апреля 2016 г.); на 82-ой Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (г. Уфа, 24 апреля 2017 г.); на XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (г. Москва, 9-13 апреля 2018 г.); на 83-ой Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (г. Уфа, 23 апреля 2018 г.).

Материалы выпускной квалификационной работы отражены в 9 научных работах.

### Оценка содержания, завершенности и оформления ВКР.

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. Выдвинутые автором положения убедительно доказаны, цель работы достигнута, основные задачи успешно выполнены, выводы вполне обоснованы.

### Соответствие направлению подготовки.

ВКР соответствует направлению подготовки 06.03.01 – Биология.

**Заключение.** Выпускная квалификационная работа Хлоповой Ксении Валерьевны «СЕЛЕКЦИЯ АУТОШТАММОВ *LACTOBACILLUS SPP.* С ВЫРАЖЕННОЙ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БАКТЕРИОФАГОВ», выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора Маркушевой Татьяны Вячеславовны, является завершенной и соответствует требованиям ФГОС ВО (приказ Минобрнауки РФ №944 от 07.08.2014 г.) по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (бакалавриат).

Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Уфимского Института биологии – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 69, Тел./Факс: (347)235-57-68; E-mail: ib@anrb.ru



Ахтуганов Глеб Эдуардович

Подпись: *Ахтуганов Г.Э.*  
 Завершил: *Кочевский И.В.*  
 Инспектор по кадрам: *Кочевский И.В.*





## Отчет о проверке на заимствования №1

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

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

Организация: Башкирский государственный медицинский университет

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

ФГБОУ ВО БГМУ  
Минздрава России  
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

22.06.18г.

### ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 2983

Начало загрузки: 22.06.2018 09:09:47

Длительность загрузки: 00:00:06

Имя исходного файла: Диплом Хлоповой

Размер текста: 7477 кБ

Тип документа: Дипломная работа

Символов в тексте: 107243

Слов в тексте: 12954

Число предложений: 1184

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)

Начало проверки: 22.06.2018 09:09:55

Длительность проверки: 00:00:16

Комментарии: не указано

Модули поиска: Кольцо вузов, Модуль поиска общепотребительных выражений, Модуль поиска перефразирований Интернет, Модуль поиска Интернет, Модуль поиска переводных заимствований, Цитирование, Коллекция РГБ, Сводная коллекция ЭБС, Модуль выделения библиографических записей, Модуль поиска "БГМУ"

ЗАИМСТВОВАНИЯ

24,86%

ЦИТИРОВАНИЯ

0,8%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

74,34%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа. Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника. Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка. Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа. Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа. Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете
[01]	0,13%	2,2%	Учебно-методическое пособие для сам.	<a href="http://samzan.ru">http://samzan.ru</a>	01 Янв 2017	Модуль поиска перефразирований Интернет	1
[02]	2,19%	2,19%	Палочки грамположительные правил...	<a href="http://medluc.org">http://medluc.org</a>	30 Янв 2017	Модуль поиска перефразирований Интернет	5
[03]	2,07%	2,07%	Государственное бюджетное образова.	<a href="http://folio.ru">http://folio.ru</a>	29 Янв 2017	Модуль поиска перефразирований Интернет	1
[04]	0%	2,06%	Учебно-методическое пособие для сам.	<a href="http://samzan.ru">http://samzan.ru</a>	06 Янв 2017	Модуль поиска Интернет	0
[05]	0%	2,06%	Фаготипирование бактерий	<a href="http://wiler5.ru">http://wiler5.ru</a>	18 Авг 2016	Модуль поиска Интернет	0
[06]	1,98%	1,98%	не указано	<a href="http://mmla.ru">http://mmla.ru</a>	29 Янв 2017	Модуль поиска перефразирований Интернет	2
[07]	0%	1,9%	не указано	<a href="http://mmla.ru">http://mmla.ru</a>	07 Мая 2009	Модуль поиска Интернет	0
[08]	0%	1,84%	Гаспарян, Ани Арменовна Особенности...	<a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	12 Окт 2017	Коллекция РГБ	0
[09]	1,22%	1,81%	Микробиота кишечника коренного ж...	<a href="http://libed.ru">http://libed.ru</a>	19 Авг 2017	Модуль поиска Интернет	16
[10]	1,52%	1,52%	Методы определения антагонистическ.	<a href="http://pandia.ru">http://pandia.ru</a>	08 Янв 2017	Модуль поиска перефразирований Интернет	1
[11]	0%	1,49%	Методы определения антагонистическ.	<a href="http://pandia.ru">http://pandia.ru</a>	03 Фев 2014	Модуль поиска Интернет	1
[12]	1,29%	1,46%	Разработка способа молекулярно-ген...	<a href="https://bashgmu.ru">https://bashgmu.ru</a>	26 Дек 2017	Модуль поиска Интернет	19
[13]	0%	1,46%	Тамарова, Эльмира Рифовна Разработ...	<a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	19 Фев 2018	Коллекция РГБ	0
[14]	1,4%	1,4%	Бактериофаги, их строение, классифик...	<a href="http://studfiles.ru">http://studfiles.ru</a>	14 Июл 2016	Модуль поиска Интернет	22
[15]	1,2%	1,36%	lactobacille - définition - C'est quoi ?	<a href="https://c-est-quoi.com">https://c-est-quoi.com</a>	16 Июл 2017	Модуль поиска Интернет	16
[16]	1,24%	1,24%	Полный текст диссертации	<a href="http://folio.mosgu">http://folio.mosgu</a>	30 Янв 2017	Модуль поиска перефразирований Интернет	3