

Боровкова Екатерина Андреевна

**Использование аутопробиотикотерапии для коррекции микрoэкологических  
нарушений кишечника**

1.5.11. – микробиология

Автореферат диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
доцент

**Алиева Елена Васильевна**

**Официальные оппоненты:**

**Ильин Вячеслав Константинович** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем Российской академии наук», отдел санитарно-гигиенической безопасности человека в искусственной среде обитания, лаборатория микробной экологии человека, заведующий

**Червинец Вячеслав Михайлович** - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, заведующий

**Ведущая организация:** Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года

**Учёный секретарь**

диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

**Борисова Ольга Юрьевна**

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

На протяжении нескольких десятилетий пробиотики являются востребованными средствами профилактики и коррекции дисбиотических нарушений кишечника (Алёшкин В.А. и др., 2005; Бельмер С.В. и др., 2006; Canani R.V. et al., 2007; Lahtinen S.J. et al., 2009; Suvorov A., 2013; Zhong C. et al., 2017). Несмотря на широкое применение коммерческих пробиотических препаратов в клинической практике, восстановление и нормализация микробиоценоза кишечника наступает не всегда. Неэффективность пробиотикотерапии объясняется несовпадением региона, где были выделены пробиотические культуры и места проживания потребителя продукта (Червинец Ю.В. и др., 2018), биологическими особенностями используемых пробиотических штаммов (Глушанова Н.А., 2003), а также их биологической несовместимостью с индигенной микробиотой хозяина (Глушанова Н.А. и др., 2004; 2005). Лекарственная форма пробиотика, его доза, часто не обеспечивающая необходимую концентрацию препарата в кишечнике, и недостаточная длительность приёма также могут давать неудовлетворительные результаты пробиотикотерапии (Глушанова Н.А., 2003). Имеются работы, показывающие временное пребывание пробиотических микроорганизмов в кишечнике, и их элиминацию после окончания курса пробиотикотерапии (Коршунов В.М. и др., 1996; Lin J. et al., 1986; Tannock G.W. et al., 2000; Garrido D. et al., 2005; Aleshkin V.A. et al., 2008). Коммерческие штаммы пробиотиков не образуют колоний на слизистой оболочке кишечника и не могут включаться в состав микробно-тканевого комплекса вследствие своей чужеродности (Суворов А.Н. и др., 2013), а также индивидуальности и специфичности на видовом и штаммовом уровне микробиоценоза кишечника каждого человека (Zoetendal E.G. et al., 1998; 2001). Кроме того, в ряде исследований с участием ослабленных и иммунокомпрометированных больных зафиксированы осложнения, вызванные применением пробиотиков, такие как бактериемия (Gouriet F. et al., 2012; Suárez-García I. et al., 2012), сепсис (Land M.H. et al., 2005) и эндокардит (Suárez-García I. et al., 2012).

Новым перспективным подходом к восстановлению и/или коррекции индивидуальной микробиоты кишечника является аутопробиотикотерапия. Аутопробиотики это препараты, созданные на основе аутоштаммов симбионтных индигенных микроорганизмов (Шендеров Б.А. 2001; Suvorov A., 2013; 2018; Ermolenko E. et al., 2020; Gromova L.V. et al., 2021). Предварительно отобранные и протестированные на наличие пробиотического потенциала и отсутствие факторов патогенности, аутоштаммы максимально адаптированы к существованию в составе микробиоценоза организма хозяина и формируют индивидуальный вариант его нормофлоры. Принципиальным преимуществом аутопробиотикотерапии является восстановление собственной микробиоты, обладающей наибольшим сродством к рецепторам слизистой оболочки кишечника конкретного индивидуума. Таким образом, успех в коррекции микробиоценоза кишечника обеспечит не столько введение «чужих» пробиотических микроорганизмов, сколько восстановление и поддержание популяции индигенной микробиоты. Следовательно, использование аутопробиотикотерапии для коррекции микробиоценоза кишечника при дисбиозах различной этиологии представляется весьма актуальным.

### **Степень разработанности темы исследования**

Работы советских и российских учёных, посвящённые разработке и применению пробиотиков, внесли значительный вклад в общемировую концепцию пробиотикотерапии (Гончарова Г.И., 1970; Тарасова Н.Б., 1970; Амерханова А.М., 2009; Алёшкин А.В., 2011;

Ботина С.Г., 2011; Жиленкова О.Г., 2011). Оригинальным направлением традиционной пробиотикотерапии является использование аутопробиотиков. К настоящему времени в РФ запатентовано несколько способов получения безопасных и эффективных аутопробиотиков на основе индигенных *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *E.faecium*, а также анаэробного консорциума микроорганизмов (Шендеров Б.А. и др., 1999; Черных Л.Е., 2006; Кузнецов О.Ю. и др., 2010; Суворов А.Н. и др., 2010; 2018; Симаненков В.И. и др., 2013; 2014; Денисов Д.Е. и др., 2015).

Разработчиками технологии аутопробиотикотерапии являются отечественные учёные, имеющие безусловный мировой приоритет в исследованиях по использованию аутопробиотиков для профилактики и коррекции дисбиотических нарушений, сопровождающих различные патологии. В значительной части эти исследования охватывали вопросы коррекции экспериментального антибиотикоассоциированного дисбиоза кишечника лабораторных животных (Ермоленко Е.И. и др., 2016; 2017; 2020; Suvorov A., 2018). Технология аутопробиотикотерапии успешно применялась для коррекции дисбиоза у больных с кишечной инфекцией неясной этиологии (Коршунов В.М. и др., 1984) и лечения пациентов с синдромом раздражённого кишечника (Сундукова З.Р., 2010; Симаненков В.И. и др., 2015; Соловьёва О.И. и др., 2017; Suvorov A., 2019). Новаторскими являются исследования эффективности и безопасности аутопробиотиков у пациентов с сахарным диабетом второго типа (Симаненков В.И. и др., 2020), у больных болезнью Паркинсона (Ермоленко Е.И. и др., 2020), а также у испытуемых в условиях, моделирующих воздействие факторов космического полета (Ильин В.К. и др., 2013; 2021).

Тем не менее, влияние аутопробиотикотерапии на основе аутоштаммов *Lactobacillus spp.* на микробиоценоз, морфологию и функции желудочно-кишечного тракта всё ещё изучены недостаточно. Необходимы дальнейшие исследования по использованию аутопробиотикотерапии для коррекции микробиологических нарушений кишечника, вызванных, в том числе, применением антибиотиков. В связи с чем, лактобациллы представляют особый интерес и как объект отбора перспективных аутоштаммов для разработки аутопробиотических препаратов, и для оценки эффективности их применения в контексте персонифицированной медицины.

**Цель исследования** – изучение эффективности аутопробиотикотерапии с использованием аутоштаммов *Lactobacillus spp.* в коррекции микробиологических нарушений кишечника, вызванных применением антибактериальных препаратов.

#### **Задачи исследования:**

1. Выделить штаммы *Lactobacillus spp.* из кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа и определить их видовую принадлежность.
2. Оценить пробиотический потенциал и безопасность штаммов *Lactobacillus spp.* в опытах *in vitro* (адгезивная и антагонистическая активность, антибиотикорезистентность).
3. Определить структуру генома и спектр генов антибиотикорезистентности штаммов *Lactobacillus spp.*, перспективных в качестве аутопробиотиков.
4. Охарактеризовать состав микрофлоры кишечника добровольцев до начала антибактериальной терапии, после её окончания, после курса аутопробиотиков, а также спустя три месяца после аутопробиотикотерапии.
5. Оценить эффективность аутопробиотикотерапии в восстановлении количества облигатных представителей нормофлоры кишечника (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *E.coli*) при дисбиотических нарушениях, вызванных антибактериальной терапией.

## Научная новизна

С помощью микробиологических и молекулярно-генетических методов идентификации определено видовое разнообразие индигенных штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных из кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа, и выявлено, что преобладающими в микробиоте кишечника видами являются *L.rhamnosus* (53,5%), *L.plantarum* (33,9%), *L.paracasei* (9,6%), *L.fermentum* (2,4%) и *L.brevis* (0,6%). Проведённые исследования биологических свойств индигенных *Lactobacillus spp.* продемонстрировали наличие значительного пробиотического потенциала, выражавшегося в средней адгезивной активности 76,0% штаммов и высокой антагонистической активности к патогенным и условно-патогенным тест-культурам большинства штаммов *Lactobacillus spp.* (от 59,0% в отношении *S.typhimurium* № 4922 до 100% в отношении *P.aeruginosa* ATCC 27853).

В результате впервые проведённого полногеномного секвенирования аутоштаммов *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18 описана структура генома и выявлены типичные для лактобацилл гены антибиотикорезистентности. Установлено, что в исследованных геномах не содержатся гены *ermB*, *ermC*, *tetW* и *tetM*, ассоциированные с мобильными генетическими элементами. Установлено, что использование аутопробиотиков на основе *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18 с позиции нераспространения детерминант устойчивости к антибактериальным препаратам является безопасным.

Проведённое культуральное исследование микробиоценоза кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа в возрасте от 20 до 60 лет до начала антибактериальной терапии показало наличие нормобиоценоза у 31% лиц и дисбиотических нарушений кишечника I и II степени у 23% и 46% лиц соответственно. Охарактеризован микробный пейзаж кишечника добровольцев Северо-Кавказского федерального округа, изменённый под воздействием антибиотиков, и показано снижение содержания протективной микрофлоры, а именно *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *E.coli* более чем на два порядка, повышение количества *Candida spp.*, а также снижение количества условно-патогенных *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.* вплоть до элиминации *Proteus spp.*, *E.coli lac-*, *E.coli hem+* и *Staphylococcus spp.*

Впервые в исследовании с участием добровольцев доказана эффективность аутопробиотикотерапии в коррекции микробиологических нарушений кишечника, вызванных применением антибактериальных препаратов. Показана способность аутопробиотиков на основе индигенных лактобацилл восстанавливать нарушенный антибиотиками микробиоценоз кишечника, достоверно повышая и стабилизируя содержание *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* и типичных *E.coli*.

## Теоретическая и практическая значимость

Характеристика биологических свойств и выявление высокого пробиотического потенциала индигенных штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных из кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа, позволяет применить полученные результаты для создания новых и эффективных региональных пробиотиков.

Проведённая в динамике оценка состояния микробиоценоза кишечника до и после антибактериальной терапии, а также после аутопробиотикотерапии в комплексе с созданием индивидуального аутопробиотического препарата на основе индигенных *Lactobacillus spp.* определяет новый методологический подход к коррекции дисбиотических нарушений в контексте персонафицированной медицины.

В ходе проведения исследования получены и депонированы в базу данных GenBank NCBI следующие полногеномные нуклеотидные последовательности: CP052065 – хромосома *L.paracasei* 347–16, CP052066 – плаزمида 1 *L.paracasei* 347–16, CP052067 – плазмида 2 *L.paracasei* 347–16; CP046656 – хромосома *L.plantarum* 123–17, CP046657 – плазмида 1 *L.plantarum* 123–17, CP046658 – плазмида 2 *L.plantarum* 123–17, CP046659 – плазмида 3 *L.plantarum* 123–17, CP046660 – плазмида 4 *L.plantarum* 123–17; CP046661 – хромосома *L.plantarum* 83–18, CP046662 – плазмида 1 *L.plantarum* 83–18, CP046663 – плазмида 2 *L.plantarum* 83–18, CP046664 – плазмида 3 *L.plantarum* 83–18, CP046665 – плазмида 4 *L.plantarum* 83–18, CP046666 – плазмида 5 *L.plantarum* 83–18, CP046667 – плазмида 6 *L.plantarum* 83–18, CP046668 – плазмида 7 *L.plantarum* 83–18, CP046669 – плазмида 8 *L.plantarum* 83–18.

Предложенный алгоритм микробиологического мониторинга состава микрофлоры кишечника и коррекции микрoэкологических нарушений с помощью аутопробиотиков на основе *Lactobacillus spp.* позволяет одновременно решать ряд важных задач: выявлять возможную степень дисбиотических нарушений кишечника; устанавливать качественные и количественные изменения микрофлоры кишечника под воздействием различных факторов, нарушающих микробный баланс, и аутопробиотикотерапии; выделять, отбирать и сохранять с помощью систем криохранения перспективные аутоштаммы *Lactobacillus spp.* для создания на их основе индивидуальных аутопробиотических препаратов.

Доказанная эффективность аутопробиотикотерапии в коррекции микробиоценоза кишечника, нарушенного применением антибиотиков, расширяет область применения данной методики, которая также может быть использована для профилактики и устранения побочных эффектов использования нестероидных противовоспалительных препаратов, гормонотерапии и др.

Практическое использование аутопробиотиков на основе бактерий рода *Lactobacillus* оптимизирует лечебную тактику клиницистов и обеспечивает персонализированный подход к коррекции нарушенного применением антибиотиков микробиоценоза кишечника. Материалы диссертации применяются в лечебно-диагностической работе Пятигорской городской поликлиники № 1 города Пятигорска (акт внедрения от 17.05.2021 г.). Методологическая база используется в работе бактериологической лаборатории Кисловодской городской специализированной инфекционной больницы города Кисловодска при проведении исследований микробиоценоза кишечника (акт внедрения от 21.05.2021 г.).

## **Методология и методы исследования**

Методология работы определена в соответствии с поставленной целью и задачами исследования. Предмет исследования – нарушения микробиоценоза кишечника, вызванные применением антибактериальных препаратов. Объект исследования – бактерии рода *Lactobacillus*, выделенные из кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа. В работе использовали общенаучные и специфические бактериологические, молекулярно-генетические, биоинформационные методы, а также методы статистической обработки результатов. На все этапы исследования с участием добровольцев было получено разрешение локального этического комитета при ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 29 от 15.05.2013 г.).

## **Образцы клинического материала**

В исследование включено 159 образцов содержимого толстого кишечника пациентов медицинских организаций Северо-Кавказского федерального округа разных

возрастных групп, из которых 69 образцов фекалий были получены от пациентов ГБУЗ СК «Кисловодская городская детская больница» (ГБУЗ СК «Кисловодская ГДБ»), 58 образцов фекалий, полученных от пациентов ГБУЗ СК «Кисловодская городская больница» (ГБУЗ СК «Кисловодская ГБ»), 15 образцов фекалий, полученных от пациентов ГБУЗ СК «Кисловодская городская специализированная инфекционная больница» (ГБУЗ СК «КГСИБ»), а также 17 образцов фекалий, полученных от пациентов ГБУЗ СК «Пятигорская городская поликлиника № 1». Биоматериал доставлялся в бактериологическую лабораторию ГБУЗ СК «Кисловодская ГБ» по направлению от врачей вышеуказанных медицинских организаций в период с 2016 по 2018 гг.

### **Штаммы микроорганизмов**

В работе использованы типовые коллекционные штаммы микроорганизмов: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, полученные из Американской коллекции типовых культур; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* № 4922 и *Shigella sonnei* “S-форм” № 4385, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – ОБОЛЕНСК» ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, а также 159 индигенных штаммов *Lactobacillus* spp., выделенных из кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа в 2016-2018 гг.

### **Добровольцы**

Для коррекции микроэкологических нарушений кишечника с использованием аутопробиотиков на основе индигенных *Lactobacillus* spp. была сформирована группа из 78 добровольцев в возрасте от 20 до 60 лет. Критериями включения являлись: возраст старше 18 лет; отсутствие антибактериальной терапии в течение двух предыдущих месяцев до первичного микробиологического исследования фекалий; предстоящая антибактериальная терапия, назначенная клиницистом; отсутствие пробиотической терапии коммерческими препаратами. От всех добровольцев было получено информированное согласие на сбор и обработку биоматериала, а также на аутопробиотикотерапию.

### **Микробиологические методы исследования**

Культивирование и идентификация *Lactobacillus* spp. Биоматериал в разведениях  $10^{-3}$ – $10^{-7}$  засеивали на плотную питательную среду Лактобакагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk) и инкубировали 48–72 часа при 37°C в атмосфере с 4–10% CO<sub>2</sub> и 16% O<sub>2</sub> в газогенераторных пакетах GasPack Plus (Becton Dickinson, США). Первичную идентификацию проводили по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам с использованием тест-системы API 50 CH (bioMérieux, Франция).

Адгезивную активность *Lactobacillus* spp. определяли по методике В.И. Брилис (1986), вычисляя средний показатель адгезии (СПА) на эритроцитах человека 0 (I) группы Rh+.

Антагонистическую активность *Lactobacillus* spp. определяли с помощью метода двухслойного агара в соответствии с МУ 2.3.2.2789–10.2.3.2 «Продовольственное сырьё и пищевые продукты. Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов».

Определение чувствительности к антибиотикам *Lactobacillus* spp. проводили с помощью метода серийных разведений в бульоне с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) на тест-системах СЕНСИЛАТЕСТ МПК (Erba Lachema, Чехия). Результаты учитывали по клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» версия–2018–03.

Приготовление аутопробиотических кисломолочных заквасок осуществляли по методике, разработанной и зарегистрированной в ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины» (Санкт-Петербург, Россия) (свидетельство о регистрации № 557–1406–п от 18.11.2014 г.) и изложенной в методических рекомендациях «Аутопробиотическая профилактика и лечение дисбиотических расстройств» (Симаненков В.И., 2020).

Микробиологическое исследование фекалий производили путём посева десятикратных разведений биоматериала на жидкие и плотные питательные среды: агар Плоскирева-ГРМ, агар Эндо-ГРМ, Висмут-сульфит-ГРМ агар, селенитовый бульон, цитратный агар Симмонса, Энтерококкагар, агар Сабуро, среду Блаурокка (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), среду Вильсон-Блера (НИЦФ, Санкт-Петербург), 5% кровяной агар (ООО «Средофф», Санкт-Петербург). Посевы культивировали в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях при 37°C 24–72 часа. Идентификацию микроорганизмов проводили по культуральным, морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Степень микробиологических нарушений микробиоценоза кишечника определяли по отраслевому стандарту ОСТ 91500.11.0004–2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника».

### **Молекулярно-генетические методы исследования**

Выделение хромосомной ДНК проводили по стандартному протоколу фенол-хлороформной экстракции.

Мультиплексную полимеразную цепную реакцию (М-ПЦР) проводили с помощью набора Taq AB мастер-микс (зеленый) (ООО «Компания Алкор Био», Россия) и специфичных праймеров (Цапиева А.Н., 2020) на базе ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины» (Санкт-Петербург, Россия).

Секвенирование ДНК методом Сэнгера проводили на базе ООО «Синтол» (Москва, Россия).

Полногеномное секвенирование ДНК проводили на базе научного центра BIOZERON Co., Ltd (Шанхай, Китай) на платформах PacBio RS II и Illumina HiSeq 4000.

### **Биоинформационные и статистические методы исследования**

Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программы BLAST (<https://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Аннотацию геномов *Lactobacillus spp.* проводили с помощью сервера RAST (<https://rast.nmpdr.org/>). Анализ структурных изменений в геноме по сравнению с референсной последовательностью проводили в программе Mauve 2.4.0. Построение филогенетического древа проводили с помощью онлайн сервиса CSI Phylogeny (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>). Поиск и функциональный анализ генов антибиотикорезистентности проводили с помощью программы RAST и Resistance Gene Identifier (RGI 5.1.0) базы данных Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD 3.0.8). Адресный поиск генов антибиотикорезистентности выполняли с помощью BLAST базы данных GenBank NCBI.

Для накопления, статистического анализа и визуализации данных использовали программу Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, США). Данные представляли в виде абсолютных величин и процентных долей, а также средней арифметической ( $M$ ) и ошибки средней ( $m$ ). Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова, Краскела-Уоллиса и  $W$ -критерия Уилкоксона. Результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### **Личное участие автора в получении результатов**

Автором самостоятельно проведен анализ литературных источников, разработан дизайн научного исследования и выполнен весь объем микробиологических исследований,

включавший выделение, идентификацию, изучение биологических свойств и пробиотического потенциала индигенных штаммов *Lactobacillus spp.* Самостоятельно приготовлены все партии аутопробиотических кисломолочных заквасок индивидуально для каждого добровольца.

Четырёхкратное микробиологическое исследование фекалий для каждого добровольца проведено совместно с заведующей бактериологической лабораторией, врачом-бактериологом высшей квалификационной категории ГБУЗ СК «Кисловодская городская больница» Фроловой Т.В. Идентификация лактобацилл с помощью метода М-ПЦР проведена совместно с научными сотрудниками Отдела молекулярной биологии ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины» Карасёвой А.Б. и Цапиевой А.Н. Биоинформационный анализ данных полногеномного секвенирования аутоштаммов *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18 проведён совместно с сотрудниками ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора» Ковалёвым Д.А. и Шапаковым Н.А. Коррекция микрoэкологических нарушений кишечника, вызванных применением антибиотиков в группе добровольцев, проводилась на базе ГБУЗ СК «Кисловодская городская больница» совместно с заведующей отделением гипербарической оксигенации, врачом-терапевтом Биджиевой Ф.А., заведующим урологическим отделением, врачом-урологом высшей квалификационной категории, д.м.н. Боташевым А.А., врачом-хирургом высшей квалификационной категории Севостьяновым А.С. под руководством заместителя главного врача по медицинской части ГБУЗ СК «Кисловодская городская больница», к.м.н. Халина Д.А.

Автором самостоятельно проведены статистическая обработка и анализ результатов исследования, сформулированы выводы и перспективы дальнейшей разработки темы.

### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. Штаммы *Lactobacillus spp.*, выделенные из кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа, были представлены преобладающими в интестинальной микробиоте человека видами, проявляли потенциальные пробиотические свойства и соответствовали критериям биологической безопасности, предъявляемым к пробиотическим микроорганизмам, что позволяло безопасно и эффективно их использовать в качестве аутопробиотиков.
2. Аутопробиотикотерапия с использованием аутоштаммов *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18 является безопасной с позиции нераспространения приобретённой антибиотикорезистентности, поскольку исследованные геномы не содержали гены устойчивости к антибиотикам, ассоциированные с мобильными генетическими элементами.
3. Аутопробиотикотерапия с использованием аутоштаммов лактобацилл продемонстрировала свою эффективность в коррекции микрoэкологических нарушений кишечника, вызванных применением антибактериальных препаратов, способствуя достоверному повышению содержания *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *E.coli*.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность полученных результатов подтверждается наличием первичной документации, большим объёмом выборки исследованных штаммов лактобацилл, значительным числом добровольцев, принимавших участие в исследовании, а также большим объёмом проведенных исследований. Изучены биологические свойства 159 штаммов лактобацилл, выделенных из клинического материала от пациентов медицинских учреждений Северо-Кавказского федерального округа. Аутопробиотикотерапия проведена

78 добровольцам (28 мужчинам и 50 женщинам в возрасте от 20 до 60 лет). В работе применяли современные высокочувствительные, специфичные микробиологические и молекулярно-генетические методы, которые поддерживаются программным обеспечением, позволяющим проводить биоинформационный и статистический анализ данных на сертифицированном и поверенном оборудовании.

Работа выполнена в рамках НИР кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом бактериологии ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России «Роль микробиоты влагалища в патогенезе гинекологической патологии» (Рег. № АААА–А17–1171228500074). Диссертация апробирована на расширенном заседании кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом бактериологии ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 29.04.2021).

Материалы диссертационной работы представлены на 6 научно-практических конференциях: VI научно-практической междисциплинарной конференции «Актуальные вопросы диагностики и лечения заболеваний микробной этиологии», Железноводск, 2014; IX научно-практической междисциплинарной конференции «Актуальные вопросы диагностики и лечения заболеваний микробной этиологии», Ставрополь, 2017; XXI Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (Кашкинские чтения), Санкт–Петербург, 2018; XXII Российско-китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (Кашкинские чтения), Санкт-Петербург, 2019; XI научно-практической междисциплинарной конференции «Актуальные вопросы диагностики и лечения заболеваний микробной этиологии», Ставрополь, 2019; 2-ой Научной конференции с международным участием «Микробиота человека и животных», Санкт-Петербург, 2020.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях, 1 публикация в другом издании, 5 тезисов в рецензируемых изданиях, 1 – в материалах конференций.

### **Объем и структура диссертации**

Материалы диссертационной работы изложены на 156 страницах машинописного текста и иллюстрированы 19 таблицами, 16 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, включающего 207 источников, из которых 71 – отечественных, 136 – зарубежных авторов, приложения.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Биологические свойства индигенных штаммов *Lactobacillus spp.***

Концепция аутопробиотикотерапии предполагает использование аутоштаммов микроорганизмов нормофлоры для восстановления или коррекции индивидуальной микробиоты. Выбор штамма для создания аутопробиотика базируется на оценке его безопасности, а также наличии свойств, обуславливающих пробиотический эффект в организме. Изучение биологических свойств, пробиотического потенциала и безопасности штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных в 2016 – 2018 гг. из кишечника добровольцев, проживающих на территории Северо-Кавказского федерального округа (СКФО), проводили с помощью комплекса микробиологических и молекулярно-генетических методов исследования.

### Выделение и идентификация *Lactobacillus* spp.

Индигенные лактобациллы кишечника выделяли у жителей СКФО разных возрастных групп, не принимавших антибиотики и коммерческие пробиотики в течение двух предыдущих месяцев до забора биоматериала. Для первичной идентификации отбирали характерные колонии, микроскопировали и определяли каталазную активность. К бактериям рода *Lactobacillus* относили грамположительные, палочковидные, неспорообразующие, не обладающие каталазой микроорганизмы. 40 из 159 штаммов идентифицировали с помощью диагностической тест-системы API 50 CH (bioMérieux, Франция). В результате выявлено: *L.rhamnosus* – 18 культур (45%), *L.plantarum* – 15 культур (37,5%), *L.paracasei* – 5 культур (12,5%), *L.brevis* – 1 культура (2,5%) и *L.fermentum* – 1 культура (2,5%). В связи с трудностями, возникшими при дифференциации видов *L.paracasei*, *L.rhamnosus*, *L.plantarum* и *L.pentosus* с помощью API 50 CH, появилась необходимость в применении современных молекулярно-генетических методов, таких как М-ПЦР и секвенирование отдельных участков генома бактерий.

Из общего числа изолятов, идентифицированных с помощью API 50 CH, 36 штаммов *Lactobacillus* spp. были позже идентифицированы с помощью М-ПЦР, в результате которой видовая принадлежность 32 изолятов (88,9%) подтвердилась, а для 4 штаммов (11,1%) молекулярно-генетическое исследование изменило их видовое название: *L.paracasei* 1381–16 на *L.rhamnosus* 1381–16, *L.plantarum* №№ 428–16, 3–17, 5–17 на *L.rhamnosus* №№ 428–16, 3–17, 5–17.

Секвенирование нуклеотидных последовательностей ДНК лактобацилл проводили для 17 произвольно выбранных штаммов, 4 из которых (№№ 428–16, 1381–16, 3–17, 5–17) были ранее идентифицированы с помощью API 50 CH и М-ПЦР, а 13 штаммов (№№ 346–16, 383–16, 392–16, 405–16, 1464–16, 1480–16, 67–17, 184–17, 817–17, 1061–17, 87–18, 23–18, 40–18) были идентифицированы только методом М-ПЦР. Полученные нуклеотидные последовательности проявили высокое сходство (97–99%) с последовательностями 16S рРНК референс-штаммов *L.plantarum* CIP 103151 (NR\_104573.1), *L.plantarum* JCM 1149 (NR\_115605.1), *L.paracasei* NBRC 15906 (NR\_041054.1), *L.rhamnosus* NBRC 3425 (NR\_113332.1), депонированными в международной базе данных GenBank NCBI.

Таким образом, видовое разнообразие 159 штаммов лактобацилл кишечника, выделенных от пациентов медицинских учреждений СКФО разных возрастов, и определенное с помощью комбинации методов идентификации, представлено видами: *L.rhamnosus* (n=85), *L.plantarum* (n=54), *L.paracasei* (n=15), *L.fermentum* (n=4) и *L.brevis* (n=1) (Таблица 1).

Таблица 1 – Штаммы *Lactobacillus* spp., выделенные из кишечника добровольцев СКФО

Возраст пациента	Вид микроорганизма	Количество штаммов
Дети первого года жизни (21 человек)	<i>L.rhamnosus</i>	18 штаммов
	<i>L.paracasei</i>	3 штамма
Дети от года до 18 лет (48 человек)	<i>L.rhamnosus</i>	27 штаммов
	<i>L.plantarum</i>	15 штаммов
	<i>L.paracasei</i>	6 штаммов
Взрослые от 20 до 60 лет (90 человек)	<i>L.rhamnosus</i>	40 штаммов
	<i>L.plantarum</i>	39 штаммов
	<i>L.paracasei</i>	6 штаммов
	<i>L.fermentum</i>	4 штамма
	<i>L.brevis</i>	1 штамм
Итого: 159 человек	Итого: 159 штаммов	

### Адгезивная активность *Lactobacillus spp.*

Важным биологическим свойством бактерий рода *Lactobacillus* является адгезивная активность, позволяющая им колонизировать кишечный биотоп и успешно реализовывать антагонистические свойства в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. В результате изучения адгезивного потенциала индигенных лактобацилл *in vitro* на эритроцитах человека 0 (I) группы Rh+ был выявлен разброс среднего показателя адгезии (СПА) от минимального значения, составившего  $0,88 \pm 0,15$ , до максимального значения  $5,20 \pm 0,16$ . В среднем СПА в выборке составил  $3,07 \pm 0,15$  (Рисунок 1).

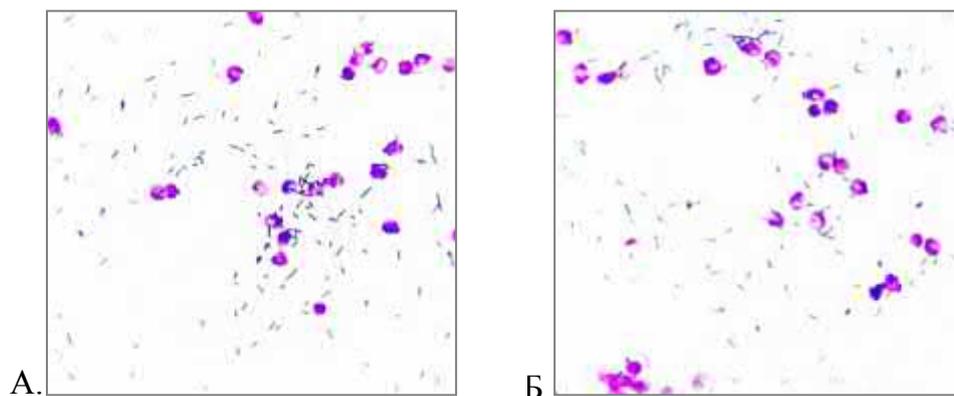


Рисунок 1 – Адгезия клеток *Lactobacillus spp.* к эритроцитам (пример)

Примечание: А – адгезия *L.rhamnosus* 428–16; Б – адгезия *L.paracasei* 41–17 (световой микроскоп Olympus CX21, Olympus Corporation, Япония; объектив  $\times 100$ ; окуляр  $\times 10$ )

СПА большинства исследованных штаммов ( $n=121$ ) составил  $3,01 \pm 0,03$ , таким образом, 76% штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных из кишечника жителей СКФО, проявляли среднюю адгезивную активность. 21% штаммов *Lactobacillus spp.* ( $n=33$ ) проявляли высокую степень адгезии к клеточным моделям (СПА  $4,76 \pm 0,06$ ). СПА 5 изолятов *Lactobacillus spp.* составил  $1,26 \pm 0,07$ , из чего следует, что лишь небольшая часть исследованных штаммов (3,0%) была низкоадгезивной.

Видовая принадлежность штаммов *Lactobacillus spp.* не влияла на степень адгезии к эритроцитам. Статистика Краскела-Уоллиса не подтвердила достоверных различий СПА среди штаммов лактобацилл, относящихся к разным видам ( $p=0,90836$ ). В таблице 2 представлены данные СПА разных видов *Lactobacillus spp.*, выделенных из микробиоценоза кишечника жителей СКФО.

Таблица 2 – СПА разных видов *Lactobacillus spp.*

Вид микроорганизма	Количество штаммов	Минимальное значения СПА	Среднее значение СПА	Максимальное значения СПА
<i>L.rhamnosus</i>	85	$0,88 \pm 0,15$	$3,1 \pm 0,20$	$5,04 \pm 0,24$
<i>L.plantarum</i>	54	$1,04 \pm 0,12$	$3,24 \pm 0,36$	$5,20 \pm 0,16$
<i>L.paracasei</i>	15	$2,04 \pm 0,11$	$2,92 \pm 0,37$	$4,92 \pm 0,20$
<i>L.fermentum</i>	4	$2,56 \pm 0,14$	$3,12 \pm 0,38$	$3,84 \pm 0,12$
<i>L.brevis</i>	1	$2,64 \pm 0,09$	$3,05 \pm 0,04$	$3,72 \pm 0,12$

### Антагонистическая активность *Lactobacillus spp.*

Исследование антагонистической активности 159 индигенных штаммов *Lactobacillus spp.* к тест-культурам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов методом двухслойного агара выявило, что большинство штаммов в выборке проявило сильную степень антагонизма в отношении всех индикаторных культур (Таблица 3).

Таблица 3 - Антагонистическая активность *Lactobacillus spp.*

Тест-культуры микроорганизмов	Количество штаммов <i>Lactobacillus spp.</i> , абс. (%)		
	Сильный антагонизм	Средний антагонизм	Слабый антагонизм
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	159 (100%)	-	-
<i>Shigella sonnei</i> «S-форм» № 4385	153 (96,2%)	3 (1,9%)	3 (1,9%)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	137 (86,1%)	19 (12,0%)	3 (1,9%)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	103 (64,8%)	39 (24,5%)	17 (10,7%)
<i>Salmonella enterica</i> subspp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> № 4922	94 (59,1%)	51 (32,1%)	14 (8,8%)

Так, все штаммы *Lactobacillus spp.* (100%) проявляли сильный антагонизм в отношении *P.aeruginosa* ATCC 27853, 153 штамма (96,2%) в отношении *S.sonnei* «S-форм» № 4385, 137 штаммов (86,1%) в отношении *E.coli* ATCC 25922, 103 штамма (64,8%) в отношении *S.aureus* ATCC 25923 и 94 штамма (59,1%) в отношении *S.typhimurium* № 4922.

100% штаммов *L.paracasei*, 79,0% штаммов *L.plantarum*, 67,0% штаммов *L.fermentum*, 55,0% штаммов *L.rhamnosus* и 50,0% штаммов *L.brevis* обладали сильной степенью антагонистической активности по отношению к *S.typhimurium* № 4922. Задержка роста тест-культуры под влиянием *L.paracasei* в среднем была  $29 \pm 2,4$  мм, *L.brevis* –  $2,9 \pm 2,0$  мм, *L.plantarum* –  $29 \pm 1,6$  мм, *L.fermentum* –  $29 \pm 0,5$  мм, *L.rhamnosus* –  $27 \pm 1,2$  мм (Рисунок 2).

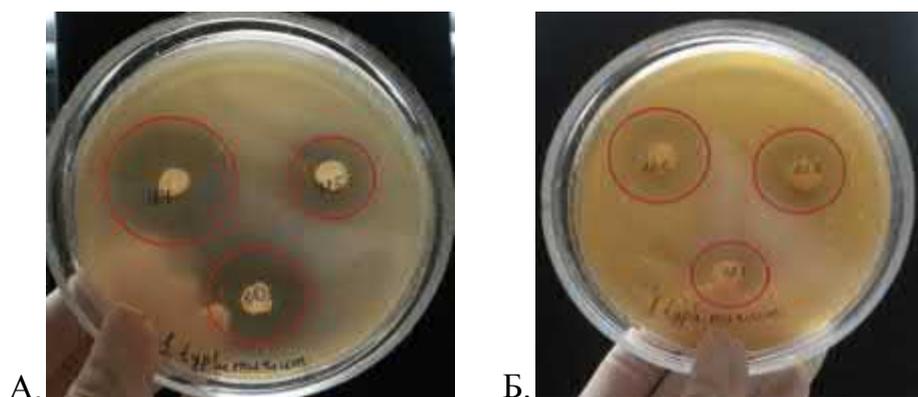


Рисунок 2 – Антагонизм *Lactobacillus spp.* к *S.typhimurium* № 4922 (пример)

Примечание: А – задержка роста тест-культуры вокруг бляшек *L.rhamnosus* №№ 400–16 (ОД), 425–16; Б – задержка роста тест-культуры вокруг бляшек *L.plantarum* №№ 201–17, 123–17

Диаметр зоны задержки роста *P.aeruginosa* ATCC 27853, образованный метаболитами *L.rhamnosus* (85 штаммов), составлял в среднем  $42 \pm 1,8$  мм, *L.plantarum* (54 штамма) –  $41 \pm 2,1$  мм, *L.fermentum* (4 штамма) –  $38 \pm 1,0$  мм, *L.paracasei* (15 штаммов) –  $37 \pm 3,0$  мм и *L.brevis* (1 штамм) –  $32 \pm 2,6$  мм. Сильными бактерицидными свойствами в отношении *S.sonnei* «S-форм» № 4385 обладали 96,0% штаммов *L.rhamnosus* и все штаммы (100%) *L.plantarum*, *L.paracasei*, *L.fermentum* и *L.brevis*. Зона задержки роста тест-культуры, образованная метаболитами *L.rhamnosus*, была в среднем  $32 \pm 1,1$  мм, *L.plantarum* –  $32 \pm 1,9$  мм, *L.paracasei* –  $29 \pm 1,5$  мм, *L.fermentum* –  $29 \pm 0,5$  мм и *L.brevis* –  $27 \pm 0,7$  мм. 100% штаммов *L.rhamnosus*, *L.plantarum* и *L.fermentum*, 83% штаммов *L.paracasei* и 67,0% штаммов *L.brevis* проявляли сильный антагонизм к *E.coli* ATCC 25922. Зона задержки роста тест-культуры, которую образовывали метаболиты *L.rhamnosus* была в среднем  $32 \pm 1,3$  мм, *L.plantarum* –  $31 \pm 2,0$  мм, *L.fermentum* и *L.paracasei* –  $30 \pm 2,0$  мм, *L.brevis* –  $35 \pm 1,2$  мм. Сильное подавление роста *S.aureus* ATCC 25923 вызывало 83,0% штаммов *L.plantarum*, 75,0% штаммов *L.rhamnosus*, 67,0% штаммов *L.fermentum* и *L.brevis*, 66,0% штаммов *L.paracasei*. Диаметр зоны задержки роста тест-культуры над бляшками с

лактобациллами составлял в среднем  $28 \pm 1,2$  мм для *L.rhamnosus*,  $26 \pm 1,6$  мм для *L.plantarum*,  $24 \pm 0,6$  мм для *L.paracasei* и *L.brevis*,  $24 \pm 0,4$  мм для *L.fermentum*.

Видовая принадлежность штаммов *Lactobacillus spp.* не влияла на степень их антагонизма в отношении анализируемых тест-культур. Статистика Краскела-Уоллиса не выявила достоверных различий между средними значениями диаметров зон задержки роста индикаторных культур под влиянием разных видов лактобацилл ( $p=0,60787$ ).

### **Антибиотикорезистентность *Lactobacillus spp.***

Для определения чувствительности 80 аутоштаммов *Lactobacillus spp.* (из которых 78 штаммов использовались в качестве аутопробиотиков) к антимикробным препаратам (АМП), были определены значения МПК бензилпенициллина, ампициллина, тетрациклина, эритромицина, хлорамфеникола, клиндамицина, цiproфлоксацина, гентамицина и ванкомицина с помощью метода последовательных разведений в бульоне в отношении 40 штаммов *L.rhamnosus*, 33 штаммов *L.plantarum*, 6 штаммов *L.paracasei* и 1 штамма *L.fermentum*. В результате было выявлено, что все штаммы (100%) *L.rhamnosus*, *L.plantarum*, *L.paracasei* и *L.fermentum* проявляли чувствительность к ампициллину, клиндамицину (МПК $\leq$ 4 мг/л), тетрациклину, эритромицину (МПК $\leq$ 1 мг/л) и хлорамфениколу (МПК $\leq$ 8 мг/л) и резистентность к гентамицину (МПК $>$ 1 мг/л) и ванкомицину (МПК $>$ 2 мг/л). К бензилпенициллину и цiproфлоксацину были устойчивы 100% штаммов *L.rhamnosus*, *L.plantarum* и *L.paracasei* при МПК $>$ 0,5 мг/л и МПК $>$ 1 мг/л соответственно. Однако штамм *L.fermentum* был чувствителен к этим антибиотикам при МПК бензилпенициллина 0,25 мг/л и МПК цiproфлоксацина 1 мг/л.

Штаммы *L.rhamnosus*, *L.plantarum*, и *L.paracasei* продемонстрировали диапазон значений МПК для всех анализируемых антибиотиков кроме ванкомицина и гентамицина. МПК $>$ 16 мг/л для этих препаратов была зафиксирована у всех 80 исследованных штаммов лактобацилл. Диапазон МПК бензилпенициллина от 0,5 до 2 мг/л наблюдался у штаммов *L.rhamnosus* и *L.plantarum*. Штаммы *L.paracasei* демонстрировали диапазон МПК бензилпенициллина от 0,5 до 1 мг/л. При этом значение МПК бензилпенициллина 0,5 мг/л, согласно которому тестируемые микроорганизмы вошли в категорию резистентных к данному антибиотику, было выявлено у 83,3% штаммов *L.paracasei*, 80,0% штаммов *L.rhamnosus* и 33,3% штаммов *L.plantarum*. Значения МПК цiproфлоксацина находились в диапазоне от 2 до 16 мг/л у штаммов *L.rhamnosus*, 2–4 мг/л у *L.plantarum* и *L.paracasei*. МПК 2 мг/л, при которой тестируемые штаммы лактобацилл определялись как устойчивые, была выявлена у 87,9% *L.plantarum*, 57,5% *L.rhamnosus* и 50,0% *L.paracasei*. Диапазон МПК ампициллина от 0,5 до 4 мг/л был выявлен у штаммов *L.plantarum*, от 0,5 до 2 мг/л у *L.rhamnosus* и от 0,5 до 1 мг/л у *L.paracasei*. МПК клиндамицина в диапазоне 1–4 мг/л определялась у штаммов *L.rhamnosus* и *L.plantarum*, в диапазоне 1–2 мг/л у штаммов *L.paracasei*. Для тетрациклина и эритромицина был выявлен диапазон МПК 0,5–1 мг/л в тестах со штаммами *L.rhamnosus* и *L.paracasei*. МПК тетрациклина от 0,25 до 1 мг/л и МПК эритромицина от 0,12 до 1 мг/л наблюдалась у штаммов *L.plantarum*. Все штаммы *L.rhamnosus*, *L.plantarum*, и *L.paracasei* демонстрировали диапазон значений МПК хлорамфеникола 2–4 мг/л.

### **Молекулярно-генетическая характеристика аутоштаммов *Lactobacillus spp.***

#### **Характеристика генома *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18**

Для изучения структуры генома и поиска генов антибиотикорезистентности было проведено полногеномное секвенирование генома аутоштаммов *L.paracasei* 347–16 и *L.plantarum* №№ 123–17, 83–18.

Биоинформационный анализ данных секвенирования геномной ДНК *L.paracasei* 347–16 позволил получить 3 скаффолда, соответствующие 1 хромосоме и 2 плазмидам микроорганизма. Общая длина нуклеотидной последовательности генома составила 3,219,033 пар оснований (п.о.). Средний уровень покрытия – 389. ГЦ состав – 46,1%. При аннотации генома с помощью сервера RAST было выявлено 3290 белок кодирующих последовательностей и 74 открытых рамок считывания РНК.

В ходе биоинформационного анализа данных секвенирования ДНК *L.plantarum* 123–17 было получено 5 скаффолдов, соответствующих 1 хромосоме и 4 плазмидам. Общая длина нуклеотидной последовательности составила 3,238,595 п.о., средний уровень покрытия – 8.5. ГЦ состав – 44,6%. Аннотация генома с помощью RAST выявила 2993 белок кодирующих последовательностей и 83 открытых рамок считывания РНК. С помощью программного обеспечения MAUVE было обнаружено 7 делеций и 2 инверсии (полностью плазида 1 и плазида 3) относительно референсного штамма *L.plantarum* WCFS1 (№ GenBank NC\_004567.2).

Геном *L.plantarum* 83–18 включал 1 хромосому и 8 плазмид. Общая длина нуклеотидной последовательности – 3,363,821 п.о., средний уровень покрытия – 263.9. ГЦ состав – 44,4%. Аннотация генома с помощью RAST выявила 2969 белок кодирующих последовательностей и 95 открытых рамок считывания РНК (Таблица 4).

Таблица 4 – Характеристика геномов *L.paracasei* 347–16 и *L.plantarum* №№ 123–17, 83–18

Структурная единица генома	№ GenBank	Размер, п.о.	% ГЦ	Число белок кодирующих последовательностей	Количество рРНК	Количество тРНК	Количество генов	Количество псевдогенов
<i>L.paracasei</i> 347–16								
Хромосома	CP052065	3102350	46,3	2896	15	61	3056	92
Плазида 1	CP052066	64761	43,4	61	–	–	69	–
Плазида 2	CP052067	51922	42,0	54	–	–	57	–
<i>L.plantarum</i> № 123–17								
Хромосома	CP046656	3191354	44,6	2902	16	67	2996	63
Плазида 1	CP046657	31650	39,9	34	–	–	38	4
Плазида 2	CP046658	8356	36,2	11	–	–	14	3
Плазида 3	CP046659	5011	47,7	6	–	–	6	–
Плазида 4	CP046660	2224	38,1	2	–	–	3	1
<i>L.plantarum</i> 83–18								
Хромосома	CP046669	3,081,029	44,8	2757	16	79	2969	113
Плазида 1	CP046661	67,195	38,4	68	–	–	76	8
Плазида 2	CP046662	62,644	39,9	62	–	–	71	9
Плазида 3	CP046663	44,868	41,6	25	–	–	42	17
Плазида 4	CP046664	41,742	41,2	37	–	–	43	6
Плазида 5	CP046665	41,364	40,9	36	–	–	45	9
Плазида 6	CP046666	12,188	36,9	11	–	–	14	3
Плазида 7	CP046667	8,486	35,3	10	–	–	11	1
Плазида 8	CP046668	4,305	43,2	5	–	–	5	–

**Гены антибиотикорезистентности *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18**

Данные о выявленных детерминантах устойчивости к АМП представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Гены антибиотикорезистентности, локализованные на хромосомах *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18

Класс АБП	Гены/кластер генов АБР	<i>L. paracasei</i> 347–16	<i>L. plantarum</i> 123–17	<i>L. plantarum</i> 83–18
Фторхинолоны	ДНК-гираза <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i>	++	++	++
	Топоизомераза IV <i>parC</i> , <i>parE</i>	++	++	++
β-лактамы	Металл-зависимая гидролаза семейства β-лактамаз	+	+	+
Тетрациклины	Тетрациклин резистентные рибосомальные защитные белки <i>tetM</i> , <i>tetS</i> , <i>tetW</i>	---	---	---
	Эффлюксные помпы <i>tetL</i> , <i>tetP</i>	--	-+	-+
Макролиды, линкозамиды, стрептограммины	Белки эффлюксных помп	+	+	+
Гликопептиды	D-аланин–D-аланин лигаза <i>ddl</i>	+	+	+
Аминогликозиды	Ацетилтрансфераза <i>aac(6')</i>	+	+	+
	Нуклеотидилтрансфераза <i>ant(3'')</i>	-	-	+

С помощью RAST были обнаружены нуклеотидные последовательности генов, ассоциированные с резистентностью к фторхинолонам, а именно *gyrA* и *gyrB*, кодирующие А и В субъединицы ДНК-гиразы, а также *parC* и *parE*, кодирующие А и В субъединицы топоизомеразы IV. Кроме того, был обнаружен ген, кодирующий металл-зависимую гидролазу семейства бета-лактамаз (ЕС 3.5.2.6). У штаммов *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18 также были выявлены гены, аннотированные RAST как ответственные за устойчивость к тетрациклинам, и гены, отвечающие за синтез эффлюксных насосов, обеспечивающих множественную лекарственную устойчивость. На плаزمидах анализируемых штаммов с помощью программы RAST гены антибиотикорезистентности обнаружены не были.

С помощью RGI были выявлены кодирующие последовательности генов антибиотикорезистентности, имеющие различную степень сходства (от 20,6% до 72,2%) с последовательностями из базы данных CARD. На хромосоме штамма *L.paracasei* 347–16 было выявлено 208 кодирующих последовательностей, а на хромосомах штаммов *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18 было определено 182 и 174 таких гена соответственно. Наибольшее число выявленных последовательностей имело сходство с генами, кодирующими эффлюксные насосы, которые потенциально могут обеспечивать устойчивость к макролидам, линкозамидам, стрептограмминам, триметоприму и тетрациклину. Также были обнаружены гены, отвечающие за резистентность к фторхинолонам, и гены, потенциально кодирующие устойчивость к гликопептидным антибиотикам. Гены, кодирующие белки семейства ацетилтрансфераз *aac(6')*, были обнаружены у всех трех штаммов лактобацилл, а ген, кодирующий белок семейства нуклеотидилтрансфераз *ant(3'')*, был найден у штамма *L.plantarum* 83–18. Кроме того, на трех плаزمидах штамма *L.plantarum* № 83–18 было обнаружено шесть генов, кодирующих ацетилтрансферазу, гликозилтрансферазу и эффлюксные насосы.

При направленном поиске генов антибиотикорезистентности с помощью инструмента BLAST базы данных NCBI GenBank были обнаружены гены, кодирующие

фермент D–аланин–D–аланин лигазу (Ddl), связанные с устойчивостью лактобацилл к ванкомицину. При рассмотрении последовательности пептидов, кодируемых этими генами, было установлено, что все они относятся к F-типу, то есть остаток тирозина в позиции 261 аминокислотной последовательности фермента Ddl был замещён остатком фенилаланина. Также с помощью алгоритма BLAST в геномах *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18 были обнаружены гены *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*. Исследование нуклеотидных последовательностей пептидов, кодируемых генами *parC* и *gyrA* у всех трех штаммов лактобацилл, показало отсутствие аминокислотных замен Glu84Gly в последовательности *parC* и Glu87Leu в последовательности *gyrA*.

С помощью инструмента BLAST в геномах штаммов *L.plantarum* №№ 123–17 и 83–18 был также проведен целенаправленный поиск генов, участвующих в обеспечении устойчивости к тетрациклинам: *tetM*, *tetS* и *tetW*, кодирующих рибосомальные защитные белки, а также *tetL* и *tetP*, кодирующих эффлюксные помпы. В качестве референсных последовательностей были выбраны последовательности пептидов TetM (AAN84501.1), TetS (Q2UXR9), TetW (ABO43851.1) TetL (WP\_098034698) и TetP (SPS13865.1). Выравнивание референсных последовательностей пептидов и хромосомных контигов штаммов *L.plantarum* №№ 123–17 и 83–18 с использованием алгоритма tblastn показало совпадение около 27% с TetM, 29% с TetS, 27% с TetW, 28% с TetL и 70% с последовательностью TetP у обоих штаммов. Последовательность пептида TetP была выровнена также на последовательность хромосомы штамма *L.paracasei* 347–16, однако в данном случае процент сходства последовательностей не превышал 37.31%. В результате, в геномах штаммов *L.plantarum* №№ 123–17 и 83–18 был найден ген, кодирующий пептид на 70% сходный по последовательности с нуклеозид-трифосфат фосфатазой TetP, ассоциированной с резистентностью к тетрациклину.

### **Динамика микрофлоры кишечника под воздействием антибиотиков и аутопробиотикотерапии**

#### **Алгоритм микробиологического мониторинга состояния микробиоценоза кишечника**

В нашем исследовании был разработан алгоритм проведения микробиологического мониторинга состояния микрофлоры кишечника, что позволило выявить нормобиоз и разные степени микробиологических нарушений кишечника у 78 добровольцев с параллельным выделением индигенных штаммов *Lactobacillus spp.* при первичном исследовании интестинального микробиоценоза (Рисунок 3).

Критериями отбора штаммов *Lactobacillus spp.* для последующего создания аутопробиотиков являлись: принадлежность к виду с документированной историей безопасного применения, высокая антагонистическая активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и адгезивная активность не ниже средней, изученный спектр фенотипической антибиотикорезистентности. Экзогенным фактором, воздействующим на микробиоценоз, являлось применение антибиотиков, поэтому, при вторичном культуральном исследовании были охарактеризованы качественные и количественные изменения микробиоценоза кишечника у участников исследования после антибактериальной терапии. Кроме того, предложенный алгоритм позволил оценить эффективность аутопробиотикотерапии в коррекции микробиологических нарушений с помощью аутоштаммов *Lactobacillus spp.* сразу после её проведения и три месяца спустя.



Рисунок 3 – Алгоритм микробиологического мониторинга состояния микробиоценоза кишечника и его коррекции с помощью аутопробиотиков на основе *Lactobacillus spp.*

Примечание: \* по Отраслевому стандарту 91500.11.0004–2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника»

### Качественный и количественный состав микрофлоры кишечника добровольцев до антибактериальной терапии

В результате первичного культурального исследования микробиоценоза кишечника добровольцев были сформированы три группы наблюдения: группа «Нормобиоценоз» – 24 человека (31%), группа «Нарушения микробиоценоза I степени» – 18 человек (23%) и группа «Нарушения микробиоценоза II степени» – 36 человек (46%) (Таблица 6).

Таблица 6 – Качественный и количественный состав микрофлоры кишечника добровольцев до антибактериальной терапии

Вид микроорганизмов	Группа 1		Группа 2		Группа 3	
	M±m lgKOE/г	(%)*	M±m lgKOE/г	(%)*	M±m lgKOE/г	(%)*
<i>Bifidobacterium spp.</i>	9,50±0,51	100	8,22±0,80	100	7,83±0,69	100
<i>Lactobacillus spp.</i>	7,66±0,44	100	6,85±0,12	100	5,78±0,57	100
<i>E.coli</i>	7,80±0,20	100	6,85±0,48	100	7,76±0,32	100
<i>Enterococcus spp.</i>	7,08±0,15	100	6,62±0,30	100	6,84±0,22	100
<i>Clostridium spp.</i>	<4	0	<4	0	6,85±0,69	19,4
<i>E.coli lac-</i>	3,69±0,22	20,8	4,67±0,24	33,3	6,46±0,21	83,3
<i>E.coli hem+</i>	0	0	6,23±0,60	33,3	6,89±0,11	69,4
<i>Klebsiella spp.</i>	3,0	8,3	4,90±0,21	22,2	6,40±0,23	66,7
<i>Enterobacter spp.</i>	<2	0	<2	0	5,51±0,34	36,1
<i>Proteus spp.</i>	<2	0	<2	0	6,0	5,56
<i>Citrobacter spp.</i>	<2	0	<2	0	<2	0
<i>S.aureus</i>	0	0	0	0	3,53±0,31	16,7
<i>Staphylococcus spp.</i>	<4	0	<4	0	4,0	5,6
<i>Pseudomonas spp.</i>	<2	0	<2	0	3,30±0,30	8,3
<i>Candida spp.</i>	<3	0	<3	0	5,06±0,27	25,0

Примечание: \* высеваемость, (%)

**Качественный и количественный состав микрофлоры кишечника добровольцев после антибактериальной терапии**

Одним из критериев включения в исследование была предстоящая антибактериальная терапия, которую назначали клиницисты в связи с наличием у добровольцев патологий, требующих лечения антибиотиками. Схемы антибактериальной терапии были подобраны специалистами пульмонологического, хирургического, урологического и терапевтического профиля ГБУЗ СК «Кисловодская ГБ». В большинстве случаев участники нашего исследования проходили курс лечения цефалоспорины I–IV поколения (35,6%) и ингибиторозащищёнными пенициллинами (21,7%). В 11,7% случаев больные принимали ингибиторозащищённые пенициллины в комбинации с макролидами. Варианты комбинированной антибактериальной терапии: цефалоспорины + макролиды + метронидазол, фторхинолон + макролид и пенициллин + макролид назначались в 3,9% случаев соответственно. Реже всего проводилась терапия фторхинолонами (1,3%).

Наибольший негативный эффект применения антибиотиков заключался в статистически достоверном снижении титра и высеваемости *Bifidobacterium spp.* на один – два порядка во всех группах наблюдения. Снижение титра *Bifidobacterium spp.* на два порядка было зафиксировано у лиц групп «Нормобиоценоз» и «Нарушения микробиоценоза I степени». Наименьшее значение  $6,66 \pm 1,14$  lg КОЕ/г содержания бифидобактерий было достигнуто в группе лиц «Нарушения микробиоценоза II степени». Количество *Lactobacillus spp.* достоверно снизилось на 1 порядок во всех группах и достигло наименьшего значения  $5,99 \pm 0,96$  lg КОЕ/г в группе «Нарушения микробиоценоза I степени». Высеваемость лактобацилл составила 70,8% в группе «Нормобиоценоз», 66,7% в группе «Нарушения микробиоценоза I степени» и 69,4% в группе лиц «Нарушения микробиоценоза II степени». Наибольшее снижение зафиксировано для *E.coli* с типичными свойствами – на три порядка во всех группах наблюдения. Наименьшее значение составило  $3,85 \pm 0,52$  lg КОЕ/г в группе «Нарушения микробиоценоза I степени». При этом высеваемость данного микроорганизма достигла наименьшего значения 58,3% в группе «Нормобиоценоз». Во всех группах наблюдения была выявлена тенденция к снижению содержания *Enterococcus spp.* (Таблица 7).

Таблица 7 – Качественный и количественный состав микрофлоры кишечника добровольцев после антибактериальной терапии

Вид микроорганизмов	Группа 1		Группа 2		Группа 3	
	M±m lgКОЕ/г	(%)*	M±m lgКОЕ/г	(%)*	M±m lgКОЕ/г	(%)*
<i>Bifidobacterium spp.</i>	<b>7,21±0,75</b> ↓	66,7	<b>6,71±0,61</b> ↓	77,8	<b>6,66±1,14</b> ↓	75,0
<i>Lactobacillus spp.</i>	<b>6,06±0,95</b> ↓	70,8	<b>5,99±0,96</b> ↓	66,7	<b>5,65±0,57</b> ↓	69,4
<i>E.coli</i>	<b>4,90±0,62</b> ↓	58,3	<b>3,85±0,52</b> ↓	77,8	<b>4,39±1,00</b> ↓	75,0
<i>Enterococcus spp.</i>	6,51±0,21↓	87,5	5,71±0,54↓	83,3	5,90±0,19↓	72,2
<i>Clostridium spp.</i>	<4	0	<4	0	4,33±0,52↓	8,3
<i>E.coli lac-</i>	<2	0	<2	0	<2	0
<i>E.coli hem+</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella spp.</i>	<2	0	<b>3,50±0,50</b> ↓	11,1	<b>4,72±0,45</b> ↓	19,4
<i>Enterobacter spp.</i>	<2	0	<2	0	<b>4,55±0,28</b> ↓	19,4
<i>Proteus spp.</i>	<2	0	<2	0	<2	0
<i>Citrobacter spp.</i>	<2	0	<2	0	<2	0
<i>S.aureus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus spp.</i>	<4	0	<4	0	<4	0
<i>Pseudomonas spp.</i>	<2	0	<2	0	3,0	2,8
<i>Candida spp.</i>	<b>4,46±0,46</b> ↑	20,8	<b>4,99±0,19</b> ↑	38,9	5,44±0,17↑	25,0

Примечание: \* высеваемость, (%); жирным шрифтом отмечены статистически достоверные значения при ( $p < 0,05$ ); ↑ – значение повысилось; ↓ – значение снизилось

Нельзя не отметить снижение количества и частоты обнаружения некоторых представителей факультативной условно-патогенной микрофлоры вследствие антибактериальной терапии. Так, выявлено достоверное снижение содержания и частоты высеваемости *Klebsiella spp.* до  $3,50 \pm 0,50$  lgКОЕ/г в группе «Нарушения микробиоценоза I степени» (11,1%) и до  $4,72 \pm 0,45$  lgКОЕ/г в группе «Нарушения микробиоценоза II степени» (19,4%). Количество *Enterobacter spp.* также достоверно снизилось до  $4,55 \pm 0,28$  lgКОЕ/г при высеваемости 19,4% у лиц группы «Нарушения микробиоценоза II степени». Под воздействием антибиотиков произошла элиминация *Staphylococcus spp.*, в том числе *S.aureus*, а также некоторых представителей семейства *Enterobacteriaceae*: *Proteus spp.*, *E.coli lac-* и *E.coli hem+* из микробиоты кишечника добровольцев группы «Нарушения микробиоценоза II степени». Однако, было выявлено достоверное увеличение содержания и высеваемости *Candida spp.* до  $4,46 \pm 0,46$  lgКОЕ/г у 20,8% лиц группы «Нормобиоценоз» и  $4,99 \pm 0,19$  lgКОЕ/г у 38,9% лиц группы «Нарушения микробиоценоза I степени». В группе наблюдения «Нарушения микробиоценоза II степени» была отмечена тенденция к увеличению титра *Candida spp.* до  $5,44 \pm 0,17$  lgКОЕ/г в 25% случаев. Наблюдалось снижение высеваемости *Pseudomonas spp.* до 2,8%.

### **Качественный и количественный состав микрофлоры кишечника добровольцев после аутопробиотикотерапии**

После завершения курса приёма антибиотиков, назначенных клиницистами в соответствии с нозологией заболевания, добровольцам была предложена аутопробиотикотерапия кисломолочными заквасками на основе аутоштаммов *Lactobacillus spp.* и проведено культуральное исследование микробиоценоза кишечника после её окончания. Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Качественный и количественный состав микрофлоры кишечника добровольцев после аутопробиотикотерапии

Вид микроорганизмов	Группа 1		Группа 2		Группа 3	
	М±m lgКОЕ/г	(%)*	М±m lgКОЕ/г	(%)*	М±m lgКОЕ/г	(%)*
<i>Bifidobacterium spp.</i>	<b>9,04±0,86↑</b>	100	<b>8,61±0,77↑</b>	100	<b>8,19±0,74↑</b>	100
<i>Lactobacillus spp.</i>	<b>7,20±0,82↑</b>	100	<b>7,18±0,30↑</b>	100	<b>7,10±0,96↑</b>	100
<i>E.coli</i>	<b>6,91±0,64↑</b>	100	<b>7,51±0,42↑</b>	100	<b>7,31±0,50↑</b>	100
<i>Enterococcus spp.</i>	6,85±0,32↑	100	6,17±0,30↑	100	<b>7,50±0,12↑</b>	100
<i>Clostridium spp.</i>	<4	0	<4	0	4,0	8,3
<i>E.coli lac-</i>	<2	0	3,53±0,58	16,7	5,30±0,20↑	13,9
<i>E.coli hem+</i>	0	0	0	0	6,31±0,45↑	11,1
<i>Klebsiella spp.</i>	<2	0	<b>4,85±0,35↑</b>	11,1	5,40±0,19↑	63,9
<i>Enterobacter spp.</i>	<2	0	3,75±0,28	16,7	5,20±0,20↑	22,2
<i>Proteus spp.</i>	<2	0	<2	0	3,0	2,8
<i>Citrobacter spp.</i>	<2	0	<2	0	<2	0
<i>S.aureus</i>	0	0	0	0	3,0	2,8
<i>Staphylococcus spp.</i>	<4	0	<4	0	<4	0
<i>Pseudomonas spp.</i>	<2	0	<2	0	3,0	2,8
<i>Candida spp.</i>	4,60±0,39↓	25,0	4,02±0,15↓	38,9	4,90±0,58↓	30,6

Примечание: \* высеваемость, (%); жирным шрифтом отмечены статистически достоверные значения при (p<0,05); ↑ – значение повысилось; ↓ – значение снизилось

В целом, после применения аутопробиотиков были выявлены позитивные изменения состояния микробиоценоза кишечника добровольцев, выразившиеся в 100% высеваемости и восстановлении содержания облигатных представителей нормофлоры, которое повысилось на два порядка у *Bifidobacterium spp.*, один-два порядка *Lactobacillus spp.* и на три порядка у *E.coli* с типичными свойствами. Зафиксировано максимальное повышение

содержания бактерий родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* до  $9,04 \pm 0,86$  и  $7,20 \pm 0,82$  lgКОЕ/г соответственно в группе «Нормобиоценоз», *E.coli* с типичными свойствами до  $7,51 \pm 0,42$  lgКОЕ в группе «Нарушения микробиоценоза II степени». Выявлено достоверное увеличение титра *Enterococcus spp.* до  $7,50 \pm 0,12$  lgКОЕ в группе «Нарушения микробиоценоза II степени» и тенденция к увеличению в группах «Нормобиоценоз» и «Нарушения микробиоценоза I степени». Кроме того, выявлено повышение содержания облигатных микроорганизмов по сравнению с исходным уровнем (до воздействия антибиотиков). Так, количество *Bifidobacterium spp.* и *E.coli* с типичными свойствами повысилось на один порядок в группе «Нарушения микробиоценоза II степени», *Lactobacillus spp.* на один порядок в группе «Нарушения микробиоценоза I степени» и на два порядка в группе «Нарушения микробиоценоза II степени».

Аутопробиотикотерапия не оказала существенного влияния на содержание *Clostridium spp.*, *Citrobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, а также коагулазонегативных бактерий рода *Staphylococcus*, которое не изменилось во всех группах наблюдения. Кроме того, не было выявлено изменений в содержании *E.coli lac-*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* и *Proteus spp.* в группе лиц «Нормобиоценоз», *E.coli hem+* и *Candida spp.* в группах «Нормобиоценоз» и «Нарушения микробиоценоза I степени», *S.aureus* в группе «Нарушения микробиоценоза II степени».

Наблюдались увеличение и тенденция к увеличению содержания некоторых представителей факультативной условно-патогенной микрофлоры кишечника. Содержание *E.coli lac-*, *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.* достоверно увеличилось, а *E.coli hem+*, *Proteus spp.* и *S.aureus* были единичными находками в группах лиц с дисбиотическими нарушениями I и II степени. Так, *E.coli lac-* и *E.coli hem+* были обнаружены у 13,9% и 11,1% лиц группы «Нарушения микробиоценоза II степени» в количестве  $5,30 \pm 0,20$  и  $6,31 \pm 0,45$  lgКОЕ/г. Также у добровольцев этой группы выявлено увеличение содержания *Klebsiella spp.* до  $5,40 \pm 0,19$  lgКОЕ/г в 63,9% случаев и *Enterobacter spp.* до  $5,20 \pm 0,20$  lgКОЕ/г в 22,2% случаев. Следует отметить тенденцию к снижению количества дрожжеподобных грибов рода *Candida* во всех группах наблюдения. При этом, *Candida spp.* обнаруживались в количестве, превышающем значение нормы, у 38,9% обследованных лиц группы «Нарушения микробиоценоза I степени» и у 30,6% лиц группы «Нарушения микробиоценоза II степени» и определялись на уровне  $4,02 \pm 0,15$  lgКОЕ/г и  $4,90 \pm 0,58$  lgКОЕ/г соответственно.

### **Качественный и количественный состав микрофлоры кишечника добровольцев спустя три месяца после аутопробиотикотерапии**

Согласно данным культурального исследования интестинального микробиоценоза существенных статистически достоверных изменений микробного пейзажа в группах наблюдения не выявлено. Содержание бифидобактерий достоверно не изменилось, но наблюдалась тенденция к увеличению их титра в группах «Нарушения микробиоценоза I степени» и «Нарушения микробиоценоза II степени» по сравнению с исходным количеством, установленным при первичном бактериологическом исследовании. Выявлено повышение титра лактобацилл на два порядка в группе добровольцев с дисбиотическими нарушениями кишечника II степени. Отмечена тенденция к увеличению количества *E.coli* типичных во всех группах наблюдения при сохранении 100% частоты обнаружения.

Статистически достоверных изменений содержания *Enterococcus spp.*, а также условно-патогенных *Clostridium spp.*, *E.coli lac-*, *E.coli hem+*, *Klebsiella spp.*, *S.aureus*, *Pseudomonas spp.* и *Candida spp.* во всех группах наблюдения не выявлено (Таблица 9).

Таблица 9 – Качественный и количественный состав микрофлоры кишечника добровольцев спустя три месяца после аутопробиотикотерапии

Вид микроорганизмов	Группа 1		Группа 2		Группа 3	
	М±m IgКОЕ/г	(%)*	М±m IgКОЕ/г	(%)*	М±m IgКОЕ/г	(%)*
<i>Bifidobacterium spp.</i>	9,21±0,66	100	9,00±0,76↑	100	8,02±0,73↓	100
<i>Lactobacillus spp.</i>	7,26±0,08↑	100	7,36±0,08↑	100	7,75±0,60↑	100
<i>E.coli</i>	7,47±0,45↑	100	7,67±0,38↑	100	7,56±0,04↑	100
<i>Enterococcus spp.</i>	7,45±0,10	100	6,83±0,30	100	7,50±0,04	100
<i>Clostridium spp.</i>	<4	0	<4	0	4,0	11,1
<i>E.coli lac-</i>	<2	0	3,00↓	5,6	4,80±0,85↓	16,7
<i>E.coli hem+</i>	0	0	0	0	6,00±0,60↓	16,7
<i>Klebsiella spp.</i>	<2	0	4,59±0,11↓	11,1	5,30±0,40	63,9
<i>Enterobacter spp.</i>	<2	0	<2	0	5,78±0,57	22,2
<i>Proteus spp.</i>	<2	0	<2	0	<2	0
<i>Citrobacter spp.</i>	<2	0	<2	0	3,0	2,8
<i>S.aureus</i>	0	0	0	0	3,0	2,8
<i>Staphylococcus spp.</i>	<4	0	<4	0	4,0	2,8
<i>Pseudomonas spp.</i>	<2	0	<2	0	3,0	2,8
<i>Candida spp.</i>	<3	0	4,33±0,09	38,9	4,56±0,16	30,6

Примечание: \* высеваемость, (%); ↑ – значение повысилось; ↓ – значение снизилось

В группе добровольцев «Нарушения микробиоценоза I степени» отмечена тенденция к снижению количества *E.coli lac-* до 3,0 IgКОЕ/г, высеваемость которых составила 5,6% и *Klebsiella spp.* до 4,59±0,11 IgКОЕ/г при частоте высеваемости 11,1%. Отмечена элиминация *Enterobacter spp.* из микробиоты кишечника этой группы наблюдения. В группе добровольцев «Нарушения микробиоценоза II степени» выявлена тенденция к снижению количества *E.coli lac-* до 4,80±0,85 IgКОЕ/г при росте частоты высеваемости до 16,7% и *E.coli hem+* до 6,0 IgКОЕ/г с высеваемостью в 16,7% случаев. Содержание *Enterobacter spp.* и *Candida spp.* также диагностически значимо превышало норму и определялось на уровне 5,78±0,57 IgКОЕ/г и 4,56±0,16 IgКОЕ/г соответственно. Выявлена элиминация *Proteus spp.*, а *Citrobacter spp.* и коагулазонегативные *Staphylococcus spp.* были редкой находкой, высеваемость составила 2,8%.

### ВЫВОДЫ

1. Видовое разнообразие штаммов *Lactobacillus spp.* (n=159), выделенных из кишечника жителей СКФО, представлено: *L.rhamnosus* (53,5%), *L.plantarum* (33,9%), *L.paracasei* (9,6%), *L.fermentum* (2,4%) и *L.brevis* (0,6%).
2. Большинство штаммов *Lactobacillus spp.* (n=121; 76,0%) обладало средней степенью адгезивной активности к клеточным моделям и высокой степенью антагонизма по отношению к тест-культурам: 94 штамма (59,1%) к *S.typhimurium* № 4922, 103 штамма (64,7%) к *S.aureus* ATCC 25923, 137 штаммов (86,1%) к *E.coli* ATCC 25922, 153 штамма (96,2%) к *S.sonnei* «S-форм» и 159 штаммов (100%) к *P.aeruginosa* ATCC 27853.
3. Аутоштаммы *L.rhamnosus* (n=38), *L.plantarum* (n=33) и *L.paracasei* (n=6) в 100% были чувствительны к ампициллину, клиндамицину, тетрациклину, хлорамфениколу и устойчивы к гентамицину, ванкомицину, бензилпенициллину и ципрофлоксацину. Аутоштамм *L.fermentum* (n=1) был чувствителен к бензилпенициллину, ампициллину, клиндамицину, тетрациклину, хлорамфениколу, ципрофлоксацину и устойчив к гентамицину и ванкомицину.
4. В геномах *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18 выявлены типичные для микроорганизмов рода *Lactobacillus* и не связанные с мобильными

генетическими элементами гены антибиотикорезистентности к фторхинолонам, β-лактамам, гликопептидам и аминогликозидам, что позволяет безопасно использовать данные штаммы для создания индивидуальных аутопробиотиков.

5. У жителей СКФО (n=78) в возрасте от 20 до 60 лет до начала антибактериальной терапии выявлены как нормобиоценоз (31%), так микробиологические нарушения кишечника I (23%) и II (46%) степени. Применение антибиотиков привело к снижению содержания представителей нормофлоры, а именно: *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *E.coli*, повышению содержания *Candida spp.*, а также к снижению количества условно-патогенных микроорганизмов: *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* вплоть до элиминации *Proteus spp.*, *E.coli lac-*, *E.coli hem+* и *Staphylococcus spp.*
6. Аутопробиотикотерапия на основе индигенных штаммов *Lactobacillus spp.* показала свою эффективность в восстановлении и стабилизации содержания основных представителей нормофлоры кишечника добровольцев: *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *E. coli* при дисбиотических нарушениях, вызванных применением антибактериальных препаратов.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Изучение биологических свойств, пробиотического потенциала, а также безопасности лактобацилл, перспективных в качестве аутопробиотиков, должны проводиться с помощью комплекса микробиологических и генетических методов.

Криоконсервация отдельных штаммов лактобацилл с помощью систем длительного хранения может быть предложена широкому кругу лиц с целью создания аутопробиотиков для коррекции возможных дисбиотических состояний.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшие исследования будут направлены на детальное изучение биологических свойств и генетических характеристик микроорганизмов симбионтной резидентной нормофлоры (*Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.*) с целью создания поликомпонентных аутопробиотиков.

Планируется серия научных исследований, включающих микробиологический мониторинг состава микробиоценоза кишечника пациентов с метаболическим синдромом (артериальной гипертензией, диабетом II типа, ожирением) на фоне применения моно- и поликомпонентных аутопробиотиков.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Боровкова, Е.А.** Аутопробиотикотерапия – персонализированный подход к восстановлению микрофлоры кишечника при дисбактериозах, вызванных антибиотиками широкого спектра действия / **Е.А. Боровкова**, Е.В. Алиева, Т.В. Фролова // Материалы Всероссийского конгресса по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXI Кашкинские чтения), Санкт-Петербург, 6-8 июня 2018 г. - Проблемы медицинской микологии. – 2018. – Т. 20, № 2. – С. 56.
2. **Боровкова, Е.А.** Перспективы применения аутопробиотиков в коррекции дисбактериозов кишечника, вызванных антибиотиками широкого спектра действия у детей / **Е.А. Боровкова**, Е.В. Алиева, Т.В. Фролова // Материалы Северо-Кавказской научно-практической конференции с международным участием «Инновационные технологии в медицине детского возраста Северо-Кавказского федерального округа», Ставрополь, 27-28 сентября 2018 г. – 2018. - С. 9-11.
3. **Боровкова, Е.А.** Изучение биологических свойств и пробиотического потенциала кишечных лактобацилл / **Е.А. Боровкова**, Е.В. Алиева, Т.В. Фролова // Acta Biomedica Scientifica. – 2019. – Т. 4, № 1. – С. 124-132.

4. **Боровкова, Е.А.** Изучение видового разнообразия лактобацилл толстого кишечника, выделенных на территории Северо-Кавказского федерального округа / **Е.А. Боровкова, Е.В. Алиева** // *Материалы Всероссийского конгресса по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXII Кашкинские чтения)*, Санкт-Петербург, 12-15 июня 2019 г. - Проблемы медицинской микологии. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 46.
5. **Цапиева, А.Н.** Разработка метода идентификации индигенных лактобацилл кишечника при создании аутопробиотиков / **А.Н. Цапиева, Е.А. Боровкова, А.Б. Карасева, Е.В. Алиева, А.Н. Суворов** // *Вопросы детской диетологии.* – 2019. – Т. 17, № 3. – С. 52-59.
6. **Боровкова, Е.А.** Оценка безопасности индигенных лактобацилл кишечника, перспективных в качестве аутопробиотиков / **Е.А. Боровкова, Е.В. Алиева, Д.А. Ковалёв, Н.А. Шапаков, А.Б. Карасёва, А.Н. Цапиева, А.Н. Суворов, D. Guo, J. Yang, S. Zhao** // *Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и Технические Науки.* - 2020. - № 7. – С. 14-19.
7. **Боровкова, Е.А.** Микробиологическое исследование микрофлоры толстого кишечника на дисбактериоз в оценке эффективности аутопробиотикотерапии / **Е.А. Боровкова, Е.В. Алиева** // *Естественные и технические науки.* – 2020. - № 8 (146). – С. 24-33.
8. **Боровкова, Е.А.** Аннотация генома и поиск генов антибиотикорезистентности аутоштаммов лактобацилл кишечника / **Е.А. Боровкова, Е.В. Алиева** // *Материалы Всероссийского конгресса по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIII Кашкинские чтения)*, Санкт-Петербург, 9-11 ноября 2020 г. - Проблемы медицинской микологии. – 2020. - Т. 22, № 3. – С. 54.
9. **Боровкова, Е.А.** Аутопробиотикотерапия в коррекции микрофлоры кишечника после курса антибиотиков / **Е.А. Боровкова, Е.В. Алиева** // *Материалы 2-ой научной конференции с международным участием «Микробиота человека и животных»*, Санкт-Петербург, 18-19 сентября 2020 г. – Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. - 2020. - № 1-2. - С. 77.
10. **Боровкова, Е.А.** Изучение чувствительности к антибиотикам бактерий рода *Lactobacillus* / **Е.А. Боровкова, Е.В. Алиева** // *Материалы Всероссийского конгресса по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIV Кашкинские чтения)*, Санкт-Петербург, 9-11 июня 2021 г. - Проблемы медицинской микологии. – 2021. - Т. 23, № 2. – С. 61.

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМП	—	антимикробный препарат
ДНК	—	дезоксирибонуклеиновая кислота
КОЕ/г	—	количество колониеобразующих единиц в 1 грамме
МПК	—	минимальная подавляющая концентрация
М-ПЦР	—	мультиплексная полимеразная цепная реакция
рРНК	—	рибосомальная рибонуклеиновая кислота
СКФО	—	Северо-Кавказский федеральный округ
СПА	—	средний показатель адгезии
NCBI	—	National Center for Biotechnology Information