

На правах рукописи

**КОШЕЧКИН**  
Станислав Игоревич

**Разработка диагностической панели для изучения видового разнообразия  
вагинальных лактобактерий и оценки состояния вагинальной  
микробиоты**

03.01.06 – биотехнология  
(в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат медицинских наук  
В. В. Демкин

Москва 2018

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук.

**Научный руководитель:**

**Демкин Владимир Витальевич**, кандидат медицинских наук, заведующий Центром клеточных и генных технологий ФБУН ИМГ РАН

**Официальные оппоненты:**

**Лахтин Владимир Михайлович**, доктор биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов

**Мавзютов Айрат Радикович**, доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, г. Москва.

**Защита диссертации состоится** 26 октября 2018 г. в 11 ч на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Автореферат разослан** « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

**Учёный секретарь**

диссертационного совета  
кандидат биологических наук

**Фурсова Надежда Константиновна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Микробиота репродуктивного тракта женщин является сложной и равновесной системой, основным компонентом которой являются лактобактерии. До середины XX века все лактобактерии, выделяемые из вагинального секрета относили к одному виду - *Lactobacillus acidophilus*. Исследования уже в 21 веке с использованием молекулярно-генетических методов показали, что вагинальная микробиота представляет собой сложное микробное сообщество, в котором лактобактерии представлены несколькими видами, среди которых наиболее часто встречаются 4 вида: *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. crispatus* (Ravel et al., 2011; Srinivasan et al., 2012; Ramachandran et al., 2013). Доминирование лактобактерий служит показателем благополучия биоценоза репродуктивной системы женщины, но значение индивидуальных видов лактобактерий в поддержании нормоценоза остается неясным. Сведения о распространенности различных видов вагинальных лактобактерий могли бы помочь в решении этого вопроса, но имеющиеся данные носят противоречивый характер. Точные знания о распространенности различных видов лактобактерий и их роли в обеспечении нормального функционирования вагинального биоценоза имеют значение не только для диагностики различных состояний вагинального биоценоза, но и для разработки пробиотических препаратов и эффективных стратегий коррекции дисбиотических состояний в контексте персонализированной медицины.

Видовая идентификация лактобактерий не является тривиальной задачей. Почти 100 лет морфологические, культуральные и биохимические методы идентификации оставались единственными критериями при определении видовой принадлежности микроорганизмов. Развитие молекулярно-генетических методов исследований позволило установить новые критерии для таксономии лактобактерий и предложить новые методические подходы для видовой идентификации этих микроорганизмов. Один из таких подходов, использующий метод ПЦР в реальном времени, позволяет на своей платформе разрабатывать диагностические тест-системы для видовой идентификации и количественной оценки бактерий в сложных биологических образцах, в том числе в мультиплексном формате. Высокая фенотипическая и генетическая гетерогенность рода *Lactobacillus*, неопределенность таксономических критериев, генетический полиморфизм близкородственных видов создает немалые трудности при разработке ПЦР систем как на родовом, так и на видовом уровнях. В последнее время в связи с расшифровкой полногеномных последовательностей лактобактерий появились новые возможности для подбора генетических мишеней и разработки на их основе методов детекции и идентификации вагинальных лактобактерий.

Поэтому, разработка новых методов детекции вагинальных видов лактобактерий с возможностью их количественной оценки, учитывающих последние данные геномики и современные представления о видовом разнообразии этих бактерий, является актуальной и значимой задачей для современной науки.

### **Степень разработанности темы**

Попытки идентифицировать и количественно определить лактобактерии, используя метод ПЦР, начались достаточно давно и продолжаются до настоящего времени. В большинстве ПЦР тест-систем для амплификации лактобактериальной ДНК в качестве мишени использовали гены *16S pPHK* или спейсерный участок между генами *16S* и *23S pPHK* (Song et al., 2000). Выбор этих мишеней определялся прежде всего наличием нуклеотидных последовательностей данных генетических областей в открытых базах данных и использованием гена *16S pPHK* в качестве филогенетического маркера в таксономии бактерий. Хотя гены рРНК имеют повсеместное распространение и консервативны, их использование в качестве амплификационных мишеней несет в себе потенциальные проблемы. Во-первых, «излишняя» консервативность генов рРНК нередко приводит к проблемам со специфичностью ПЦР (Baker et al., 2003; Henriques et al., 2012), что особенно актуально для такого филогенетически сложного таксона как род *Lactobacillus*. Во-вторых, различные виды *Lactobacillus* имеют различное число копий рибосомальных оперонов, что может приводить к неверной количественной оценке.

В поисках альтернатив для дифференциации или для видоспецифической детекции вагинальных лактобактерий предлагались и другие генетические мишени: *tuf* и *hsp60*, кодирующие фактор элонгации Tu и белок теплового шока HSP60 соответственно (Balshov et al., 2014; Ramachandran et al., 2013). Выбор этих генов не был обусловлен результатом систематического поиска соответствующей мишени у заданной группы лактобактерий. Кроме того, методы на основе амплификации генов *tuf* и *hsp60* не позволяли определять интегральный показатель общего содержания лактобактерий.

**Цель исследования** - на основе сравнительного анализа геномов подобрать адекватную мишень и на основе технологии мультиплексной ПЦР в реальном времени разработать метод детекции и идентификации вагинальных лактобактерий.

#### **Задачи исследования:**

1. Подобрать генетические мишени, удобные для разработки тест-систем, предназначенных для детекции и идентификации широкого круга вагинальных видов лактобактерий.
2. Разработать тест-систему для совокупной количественной оценки вагинальных лактобацилл.

3. Разработать мультиплексные тест-системы для видовой идентификации вагинальных лактобактерий.

4. Определить аналитические характеристики разработанных тест-систем.

5. Разработать критерии оценки состояния микробиоты урогенитального тракта на основе данных количественного содержания лактобактерий и их видового состава.

6. Определить видовое разнообразие лактобактерий доминирующих в вагинальных микробиотах женщин, проживающих в Российской Федерации.

### **Научная новизна**

Впервые для видовой идентификации лактобактерий в качестве генетической мишени предложен ген *rplK*, кодирующий рибосомальный белок L11.

На основе метода ПЦР в реальном времени, обеспечивающего амплификацию маркерного участка гена *rplK*, разработана тест-система для количественного определения общего содержания лактобактерий.

Разработан метод определения интегрального количества вагинальных лактобактерий более специфичный, чем методы на основе амплификации гена *16S pPHK*.

На основе метода ПЦР в реальном времени, обеспечивающего амплификацию маркерного участка гена *rplK*, разработана не имеющая аналогов в мире диагностическая панель «Лактоспектр», позволяющая в двух реакциях идентифицировать 11 видов вагинальных лактобактерий: 4 вида индивидуально - *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jenseni* и *L. acidophilus*; два вида парно (без дифференциации) - *L. gasseri* и *L. johnsonii*; и группы лактобактерий из 5-ти видов также без дифференциации - *L. helveticus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. acetotolerans* и *L. kefiranofaciens*.

Показано, что в вагинальных микробиотах российских женщин независимо от региона проживания, в широком диапазоне возрастов, как при наличии, так и при отсутствии заболеваний органов малого таза, в качестве основных видов лактобактерий встречаются только 4 вида: *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jenseni* и *L. gasseri*. Другие виды лактобактерий встречаются крайне редко, либо являются минорными компонентами.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Предложена новая генетическая мишень – ген *rplK* – обеспечивающая по сравнению с другими мишенями более высокую специфичность для дифференциации вагинальных лактобактерий. Разработанные на ее основе тест-системы являются удобным и эффективным инструментом для исследований, направленных на изучение распространенности и роли отдельных видов лактобактерий в жизнедеятельности вагинального микробиоценоза. С помощью разработанной системы нормирования и методики математического обсчета

получаемых результатов предлагается система комплексной оценки клинического состояния микробиоты. Результаты таких исследований могут быть крайне важны как для понимания фундаментальных основ функционирования микробиоценоза женского репродуктивного тракта, так и для разработки и назначения пробиотиков для коррекции дисбиотических состояний в рамках концепции персонафицированной медицины.

### **Методология и методы исследования**

Методология диссертационной работы строилась на учете сложности видового состава вагинальных микробиот, необходимости поиска новых мишеней для генетического анализа сложных микробных комплексов, и использовании метода ПЦР в реальном времени, как одного из самых чувствительных и специфичных методов для идентификации и дифференциации микроорганизмов. Предметом исследования являлось разработка метода для изучения видового разнообразия лактобактерий и оценки состояния вагинального биоценоза. При подборе амплификационной мишени использовали оригинальный, разработанный в лаборатории исполнителя метод прямого сравнительного анализа полногеномных последовательностей. Полученный в результате сравнительного анализа список потенциальных мишеней позволил существенно сократить объем предварительных работ и идентифицировать новую мишень - ген *rplK*, структура которого позволила, в конечном итоге, разработать панель тест-систем, которые обеспечивали комплексную оценку как общего содержания лактобактерий в образце, так и определять видовой спектр. Анализ научной литературы, посвященной тематике исследования, проведен формально-логическими методами. Исследования, направленные на решение поставленных задач, осуществляли общенаучными и специфическими методами. В работе использованы молекулярно-генетические, биологические, биоинформатические и статистические методы исследований.

### **Биоинформатические методы**

Поиск мишеней для амплификации выполняли путем сравнения заданного набора геномов используя программное обеспечение, разработанное в лаборатории молекулярной диагностики ИМГ РАН на платформе MS Excel (Демкин, Кириллова, 2012). В число анализированных последовательностей были включены последовательности из незавершенных проектов полногеномного секвенирования для *L. iners* AB-1 (NZ\_ADHG01000001, scaffold\_1; 752082 п.о.), *L. jensenii* JV-V16 (NZ\_CM000953.1, noncontiguous finished; 1604632 п.о.), и полногеномные последовательности *L. johnsonii* (NC\_005362.1; 1992676 п.о.), *L. gasseri* (NC\_008530.1; 1894360 п.о.), и *L. crispatus* (NC\_014106.1; 2043161 п.о.). Последовательность *L. iners* была выбрана как референсная, а остальные как последовательности сравнения.

Подбор праймеров, расчет их термодинамических показателей, вероятность формирования вторичных структур проводили с использованием общедоступных интернет-ресурсов Primer-BLAST, Exiqon LNA™ Oligo Tools.

### **Молекулярно-генетические методы**

Нуклеиновые кислоты из клинического материала выделяли при помощи набора для выделения ДНК методом лизиса с протеиназой К (Нанодиагностика, Россия). Выделение ДНК из пробиотических препаратов проводили с использованием набора «РибоСорб» (Интерлабсервис, Россия). Секвенирование по Сенжеру проводили в ЗАО «Евроген» (Россия, Москва).

ПЦР проводили в амплификаторе с детекцией в режиме реального времени CFX96 (BioRad Laboratories inc., США). Праймеры заказывали в ЗАО «Евроген» (Россия, Москва). Такман-зонды с включенными в последовательность LNA-нуклеотидами синтезировали в ООО «ДНК-Синтез» (Россия, Москва).

### **Бактериальные и искусственные матрицы**

Препараты геномной ДНК *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii spp Bulgaricus*, *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. lactis subsp. Cremoris*, *L. plantarum*, *L. kefir*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Brevibacterium linens*, *Streptococcus thermophilus* и *Bifidobacterium longum* были любезно предоставлены Слесаревым Алексеем (Zylacta Corporation, США). ДНК *L. reuteri* DSM 17938 выделяли из пробиотического препарата «Рела лайф» (BioGaia, Швеция). Смесь ДНК *L. plantarum* и *L. fermentum* выделяли из пробиотического препарата «Лактобактерин» (Микроген, Россия). Для видов *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jenseni* и *L. helveticus* были сконструированы искусственные матрицы по оригинальному протоколу.

### **Клинический материал**

Вагинальные мазки брали у женщин, не принимавших антибиотики и не имевших полового контакта в течение суток до взятия материала. Сбор данных о женщинах, сдавших материал на анализ, производили с использованием бланка информированного согласия и анкетирования. Общий объем выборки составил 602 образца. При этом, 119 образцов получено от Духаниной Н.С. из Центра планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения города Москвы, 153 образца от Моревой Ж.Г. из Ивановской государственной медицинской академии, 259 из Медицинского центра «Открытие» (г. Чебоксары) и 74 из Женской консультации №2 (г. Королёв, Московская обл.).

### **Статистические методы**

Статистическую обработку проводили при помощи пакета программ MS Excel и R-studio, используя следующие методы:

Аналитические характеристики тест систем определяли с помощью линейного регрессионного анализа результатов ПЦР с линейкой десятикратных разведений (Bustin et al.,

2009). Уравнение для квантификации выводили из уравнения логарифмической регрессии построенного по результатам ПЦР с линейкой стандартов с известной концентрацией. Для проверки нормальности распределения данных использовали метод Шапиро – Уилка. Кластеризацию образцов проводили с использованием метода главных компонент (англ. principal component analysis, PCA). Для поиска корреляции между распространенностью доминирующих видов лактобактерий с одной стороны, и географическим местом проживания женщин, и состоянием вагинальной микробиоты с другой, использовали точный тест Фишера. Для поиска ассоциации вида лактобактерий с возрастом пациентки использовали комбинацию метода главных компонент и регрессионного анализа.

### **Результаты исследования внедрены в работу:**

Разработаны методические рекомендации «Оценка состояния вагинальной микробиоты и видовая идентификация вагинальных лактобактерий с использованием набором Лактокомплекс и Лактоспектр\_gpK».

Тест-системы Лактокомплекс и Лактоспектр\_gpK внедрены в диагностическую и исследовательскую деятельность ООО «Нанодиагностика».

Тест-системы Лактокомплекс и Лактоспектр\_gpK используются в продолжающихся исследованиях вагинальной микробиоты в ЦКП Центр клеточных и генных технологий ИМГ РАН.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Амплификационная мишень на основе гена *rplK*, кодирующего рибосомальный белок L11, имеет преимущества перед мишенями на основе генов рибосомальной РНК как для детекции и видовой идентификации вагинальных лактобактерий, так для количественного определения их интегрального содержания в силу одинаковой копийности у всех членов рода *Lactobacillus* и большей дискриминирующей способности первичной структуры гена *rplK*.

2. Метод ПЦР для определения общего содержания вагинальных лактобактерий в пробе. Метод реализован в тест-системе «Лактокомплекс» с определением основных аналитических параметров и валидацией на контрольных и клинических образцах. Преимущество тест-системы состоит в том, что в основе определения лежит амплификация гена *rplK*, который у всех потенциальных мишеней имеет одинаковое число копий.

3. На основе амплификации гена *rplK* разработана уникальная панель мультиплексных тест-систем, обеспечивающих детекцию и идентификацию 11 видов лактобактерий, потенциально способных присутствовать в вагинальном секрете. Метод реализован в тест-системе «Лактоспектр\_gpK» с определением основных аналитических параметров и валидацией на контрольных и клинических образцах.

4. При всем возможном разнообразии вагинальных лактобактерий только 4 вида: *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jenseni* и *L. gasseri*, - встречаются в качестве основных видов лактобактерий в вагинальных микробиотах российских женщин.

5. Доминирование *L. crispatus* ассоциировано с нормальной микрофлорой, а доминирование *L. iners* с вагинальным дисбиозом. Вид *L. jenseni* ассоциирован с *L. iners* и скорее всего является транзиторным на фоне отсутствия *L. crispatus* и/или *L. gasseri*.

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

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт молекулярной генетики РАН с использованием оборудования центра коллективного пользования «Центр клеточных и геномных технологий», в том числе в рамках договоров с Центром планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения города Москвы и ООО «Нанодиагностика». Работы проведены на современном оборудовании с постановкой всех необходимых контролей. Разработка тест-систем проведена в соответствии с правилами MIQE (Bustin et al. 2009). Основные результаты работ опубликованы в ведущих рецензируемых международных изданиях. Результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на 4-х Ежегодных отчетных конференциях ИМГ РАН (2014-2017), представлены на V Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням, Москва, 2013, X Юбилейном международном конгрессе по репродуктивной медицине, Москва, 2016, Международной научно-практической конференции, Омск, 2016, Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика», Москва, 2014, 2017.

Диссертация апробирована на заседании Ученого совета ФГБУН Института молекулярной генетики РАН (протокол №4 от 23 апреля 2018 г.).

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

Анализ научной литературы, основная экспериментальная часть работы, обработка и анализ полученных результатов, а также оформление результатов для представления их на научных конференциях выполнены автором самостоятельно. Автор также являлся основным участником при написании статей по результатам работы.

### **Публикации**

По материалам диссертационной работы опубликовано 7 научных работ, в том числе 2 статьи в международных рецензируемых научных журналах и 5 тезисов в материалах международных и всероссийских научных конференций.

## Объем и структура работы

Диссертация изложена на 100 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, собственные исследования, обсуждение результатов исследований, выводы, список сокращений и список литературы, содержащий 158 источников. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 21 рисунком.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Анализ геномов, подбор перспективных мишеней.

Наличие в базах данных полногеномных последовательностей для целого ряда вагинальных лактобактерий позволило предложить новый подход для разработки метода детекции и идентификации вагинальных лактобактерий. Суть этого подхода состояла в том, чтобы на основе сравнительного анализа полногеномных последовательностей найти генетические области, которые могли бы служить мишенями для целевой амплификации и идентификации тех видов лактобактерий, которые по данным метагеномных исследований наиболее характерны для вагинального микробиоценоза.

Для поиска новых генетических мишеней мы использовали разработанный в лаборатории молекулярной диагностики ИМГ РАН метод, основанный на поиске консенсусных участков в заданном наборе полногеномных последовательностей. С помощью данного метода были проанализированы полногеномные последовательности *L. gasseri*, *L. johnsonii* и *L. crispatus*, а также самые крупные фрагменты из геномных сборок *L. iners* и *L. jensenii*, составлявшие 752 тыс. и 1605 тыс. оснований, соответственно.

В результате попарного сравнения последовательности *L. iners*, взятую как референс-последовательность, с каждой из последовательностей из выше обозначенного списка, в общей сложности было выявлено около 3000 идентичных парных мотивов протяженностью 20 и более нуклеотидов. Общие гомологичные мотивы для всех 5-ти исследованных последовательностей локализовались в 139 генах. За вычетом генов *pPHK* и *mPHK* оставались 25 различных генетических областей, имеющих в своем составе 31 мотив, полностью гомологичный в геномах исследованных 5 видов лактобацилл.

Последующий анализ методом BLAST полных последовательностей 15 генов: *atpA*, *clpP*, *efG*, *gapd*, *groEL*, *gyrB*, *pheS*, *recA*, *rplB*, *rplC*, *rplK*, *rpoA*, *rpoB*, *secA*, позволил оценить степень консервативности отобранных консенсусных мотивов уже на всей базе нуклеотидных последовательностей. В конечном итоге, учитывая взаимное расположение и архитектуру консервативных и варибельных мотивов, внимание было остановлено на гене *rplK*, отвечающем за синтез рибосомального белка L11.

## Разработка групп-специфичной тест-системы на основе гена *rplK*

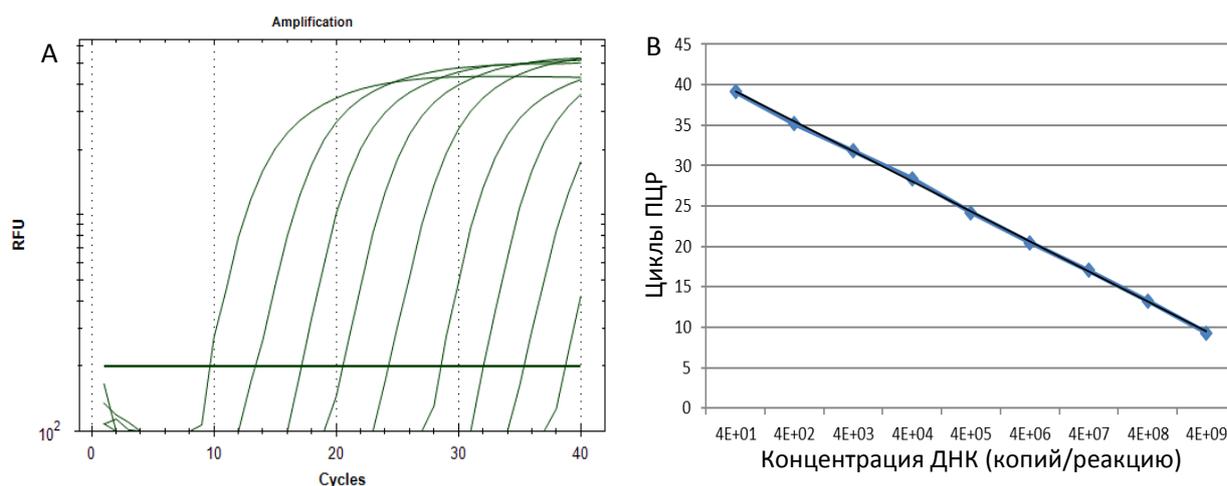
При поиске последовательностей, гомологичных гену *rplK* *L. iners*, с использованием алгоритма BLAST в базе «Whole Genome Shotgun contigs» в итоговый список попали 659 последовательностей различных видов бактерий, включая 180 последовательностей 54 видов лактобактерий. В результате анализа выровненных последовательностей гена *rplK* был определен целевой участок обеспечивающий возможность групповой детекции всех видов вагинальных лактобактерий.

Найденная мишень имела протяженность около 400 пар оснований и включала 3 консервативных только для вагинальных лактобактерий участка. В то же время, виды лактобактерий, не характерные для вагинальной микробиоты, имели в этих участках по две и более нуклеотидных замен. На данные области были разработаны и оптимизированы *in silico* кандидатные праймеры и Taqman-зонд.

Проверку специфичности праймеров и зонда *in vitro* проводили в реакциях амплификации с ДНК из 14 штаммов лактобактерий, включая *L. gasseri* и *L. acidophilus*, и других бактерий, филогенетически близких к лактобактериям, и препаратах ДНК, выделенной из человеческой крови в качестве отрицательного контроля. Для *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. helveticus* использовали искусственные матрицы, имитирующие последовательности амплифицируемых участков. Сигнал от зонда наблюдали только в реакциях с ДНК, имевшей по данным секвенирования 100% гомологии с зондом, и, напротив, матрицы, имевшие полиморфные сайты в гомологичных зонду участках, взаимодействие с зондом не демонстрировали.

Таким образом, специфичность зонда в сочетании со специфичностью праймеров ограничена узким кругом видов лактобактерий, характерных исключительно для вагинальной микробиоты, что позволяет предложить на основе этих олигонуклеотидов тест-систему для определения общего содержания лактобактерий в вагинальном секрете. Тест-система, работающая с вышеописанными праймерами и зондом, была названа «Лактокомплекс».

Для получения аналитических характеристик тест-системы «Лактокомплекс» провели серию экспериментов с линейками десятикратных разведений ДНК *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. iners*, *L. crispatus* и *L. helveticus*. Установлено, что линейный диапазон работы системы в реакциях со всеми исследованными ДНК находится в пределах от 40 до  $40 \cdot 10^9$  копий мишени в реакции. На рисунке 1 приведен пример графиков для реакций с ДНК *L. iners*.



**Рисунок 1.** Кривые амплификации и график функции линейной регрессии на примере *L. iners*.

А – кривые амплификации линейки десятикратных разведений,

В – график функции линейной регрессии.

Рассчитано уравнение работы тест-системы для количественной оценки содержания лактобактерий в клинических образцах. Аналитические характеристики тест-системы «Лактокомплекс» приведены в таблице 1. В случае количественной ПЦР в реальном времени обязательными показателями являются: М – среднее количество циклов необходимое для увеличения количества ПЦР продукта на порядок, R – коэффициент корреляции, R<sup>2</sup> – коэффициент детерминации, E – эффективность ПЦР, LOD (*limit of detection*) – предел чувствительности (Bustin et al. 2009).

**Таблица 1.** Аналитические характеристики тест-системы с групповым зондом Pb LacAAr2 на основе гена *rplK* лактобактерий.

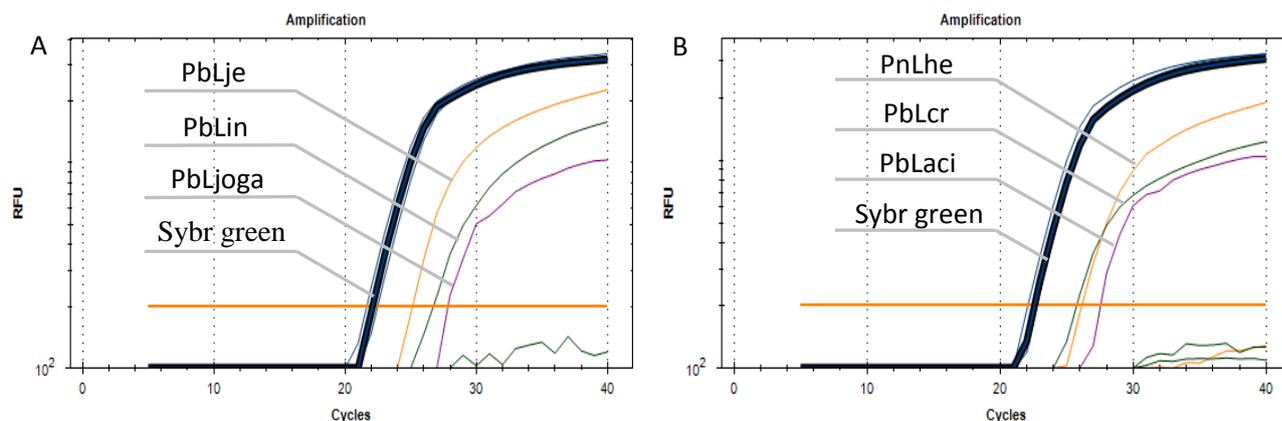
Показатель	E (%)	M (Ct)	R	R <sup>2</sup>	LOD (Копий/реакцию)
Полученное значение	93	-3,7073	0,99	0,99	40

### Разработка видо-специфичной тест-системы на основе гена *rplK*

Аmplицируемая область содержит полиморфные участки, которые обладают межвидовой специфичностью. Это позволило разработать набор зондов, обладающих дифференцирующими свойствами. Для идентификации лактобактерий *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. acidophilus* было разработано 4 видоспецифичных зонда. Последовательности гена *rplK* у *L. gasseri* и *L. johnsonii* имели очень высокий уровень гомологии, что не позволяло подобрать зонд для детекции исключительно *L. gasseri*, но позволило сконструировать зонд для детекции обоих видов. Кроме того, был обнаружен участок, гомологичный для видов

*L. helveticus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. acetotolerans* и *L. kefiranofaciens*, и пригодный для разработки Taqman-зонда на эту группу бактерий.

В результате была сформирована диагностическая панель, состоящая из 2-х наборов олигонуклеотидов, содержащих одну пару универсальных праймеров и зонды, меченные разными флуорофорами. Диагностическая панель, получившая название «Лактоспектр\_гpLK», позволяла проводить в 2-х реакциях амплификации с детекцией по 3-м каналам флуоресценции идентификацию 4-х индивидуальных видов лактобактерий (*L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. acidophilus*), одной пары видов лактобактерий (*L. gasseri* и *L. johnsonii*) и одного комплекса лактобактерий, состоящего из 5-ти видов (*L. helveticus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. acetotolerans* и *L. kefiranofaciens*). Для отслеживания возможного присутствия видов, не идентифицирующихся зондами, в обеих реакциях использовали неспецифичный краситель Sybr green. Демонстрация работы тест-системы «Лактоспектр\_гpLK» приведена на рисунке 2, аналитические характеристики приведены в таблице 2.



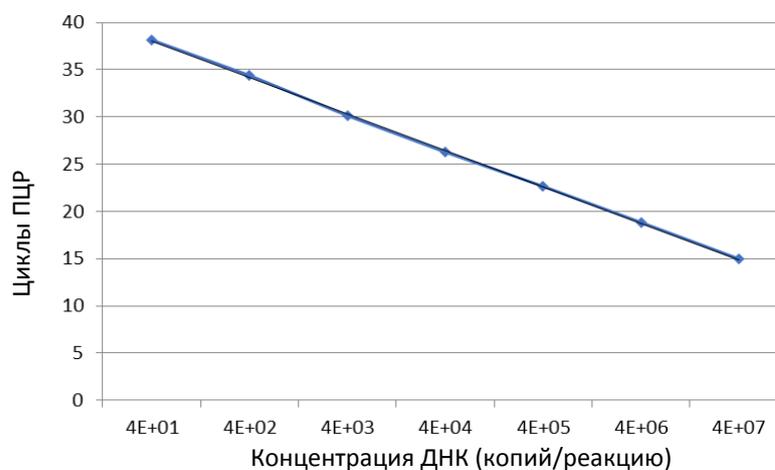
**Рисунок 2.** Амплификация специфических матриц с двумя наборами Taqman зондов

**Таблица 2.** Аналитические характеристики тест-системы «Лактоспектр\_гpLK» на основе гена *rplK* с видоспецифичными зондами.

Показатель*	PbLin	PbLje	PbLjoga	PbLcr	PbLhe	PbLaci
E (%)	91	93,5	89	91,4	88	93
M (Ct)	-3,8605	-3,675	-4,0041	-3,8177	-4,0525	-3,7007
R	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
R <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
LOD (Копий/реакцию)	200	200	200	200	200	200

M – среднее количество циклов необходимое для увеличения количества ПЦР продукта на порядок, R – коэффициент корреляции, R<sup>2</sup> – коэффициент детерминации, E – эффективность ПЦР, LOD (*limit of detection*) – предел чувствительности (Bustin et al. 2009).

Графики линейной регрессии для реакций со всеми зондами имели однотипный характер. В качестве примера приведен график для реакции с зондом *L. iners* (Рисунок 3).



**Рисунок 3.** График линейной регрессии работы системы на *rplK* с зондом PbLin.

### Разработка тест-системы на основе гена *tuf*

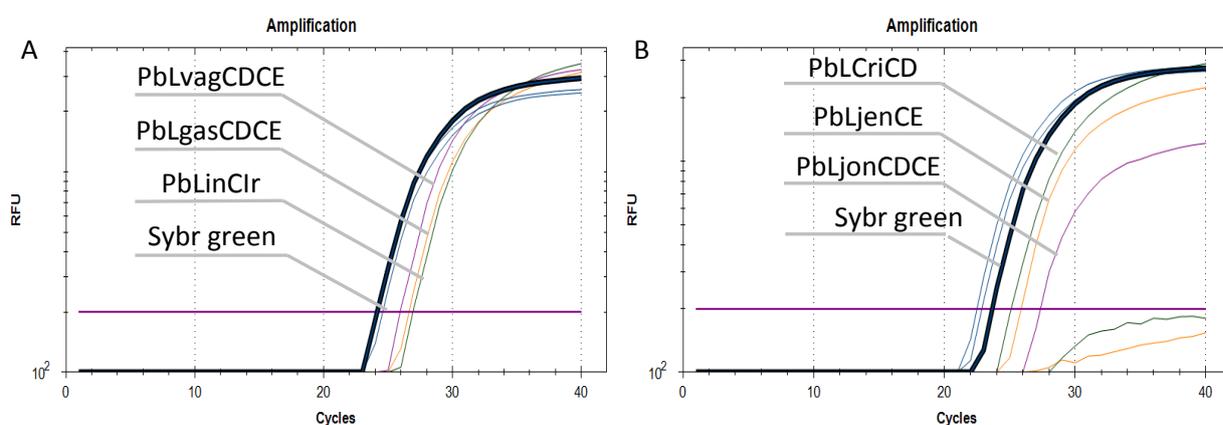
В период разработки метода идентификации вагинальных лактобактерий на основе гена *rplK* появилась публикация, в которой в качестве мишени для идентификации вагинальных лактобактерий использовали ген *tuf*, кодирующий фактор элонгации Tu (Balashov et al., 2014). Авторы предложили детекцию и типирование в одной реакции 4-х основных видов вагинальных лактобактерий: *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jenseni* и *L. gasseri*. Появление этой работы поставило перед нами задачи, оценить возможности описанной тест-системы, с одной стороны, и гена *tuf* в целом, с другой стороны, как возможной генетической мишени для детекции и идентификации вагинальных лактобактерий.

Результаты проверки специфичности предложенных олигонуклеотидов (Balashov et al., 2014) в программе «Primer-BLAST» свидетельствуют, что праймеры могут амплифицировать не менее 24 видов лактобактерий. Кроме этого, описанные праймеры потенциально были способны к образованию димеров, что снижает эффективность специфической амплификации и ухудшает аналитические показатели диагностической системы. Полученные результаты приводят к заключению, что использование праймеров, описанных в работе Balashov et. al. 2014, для анализа клинических проб может приводить к ошибкам и некорректному определению количественных показателей.

Тем не менее, на основе собственного сравнительного анализа вариабельности гена *tuf* был найден целевой участок размером 181 п.о. и подобраны универсальные праймеры, которые обеспечивали амплификацию не только основных видов *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jenseni* и *L. gasseri*, но и по крайней мере еще 5 видов (*L. johnsonii*, *L. vaginalis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*,

*L. amylovorus*), которые также могут встречаться в вагинальной микробиоте (Ravel et al., 2011; Srinivasan et al., 2012). Специфичность работы праймеров *in vitro* проверяли на искусственных матрицах *L. iners*, *L. jenseni*, *L. crispatus*, *L. vaginalis* и нативной ДНК *L. gasseri*, а также на образцах ДНК, выделенных из клинических урогенитальных мазков.

Разработано 5 зондов для специфичной детекции *L. iners*, *L. gasseri*, *L. vaginalis*, *L. johnsoni* и *L. jenseni*, и 1 зонд для группового определения *L. crispatus*, *L. helveticus* и *L. amylovorus*. Зонды метили различными флуорофорами, что позволило укомплектовать 2 набора олигонуклеотидов, обеспечивавших индивидуальную идентификацию 5-ти видов лактобактерий и комплексную идентификацию еще 3-х видов в 2-х реакциях ПЦР с детекцией по 3-м каналам флуоресценции. Демонстрация работы зондов приведена на рисунке 4, аналитические характеристики системы – в таблице 3.



**Рисунок 4.** Работа зондов на основе гена *tuf* на специфичных матрицах.

**Таблица 3.** Аналитические характеристики тест-системы на основе гена *tuf* с видоспецифичными зондами.

Показатель*	<i>L. iners</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. vaginalis</i>	<i>L. crispatus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. amylovorus</i>	<i>L. jenseni</i>	<i>L. johnsoni</i>
E (%)	96	97	94	95	95	93
M (Ct)	-3,527	-3,4836	-3,6194	-3,557	-3,5829	-3,7054
R	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
R <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99
LOD (Копий/реакцию)	400	400	400	400	400	400

M – среднее количество циклов необходимое для увеличения количества ПЦР продукта на порядок, R – коэффициент корреляции, R<sup>2</sup> – коэффициент детерминации, E – эффективность ПЦР, LOD (*limit of detection*) – предел чувствительности (Bustin et al. 2009).

Тем не менее, при проверке тест-системы «Лактоспектр\_tuf» на коллекции ДНК из 14-ти видов лактобактерий, зонд на *L. iners* показывал фоновый сигнал в реакциях с ДНК из *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum* и *L. kefir*. Преодолеть эту проблему путем изменения структуры зонда или праймеров не удалось. Так же не удалось подобрать зонд для индивидуальной детекции *L. crispatus*.

Таким образом, система детекции и идентификации лактобактерий «Лактоспектр\_tuf» не соответствовала в полной мере поставленным задачам, так как не обеспечивала индивидуальную идентификацию *L. crispatus* и специфическую детекцию *L. iners*, которые по данным литературы являются ключевыми видами вагинальной микробиоты. В дополнение, высокая степень полиморфизма данной мишени не позволила подобрать родоспецифичный зонд для оценки тотального количества лактобактерий в образце.

### **Количественная оценка содержания бактерий в образцах, содержащих ДНК двух видов лактобактерий одновременно**

Известно, что в пределах индивидуальной микробиоты может присутствовать несколько видов лактобактерий одновременно (Verhelst et al., 2005). Возможности количественной оценки содержания каждого вида в мультиплексной реакции с видоспецифичными зондами были исследованы в серии экспериментов со «смешанными» образцами, содержащими ДНК 2-х видов лактобактерий. «Смешанные» образцы готовили, смешивая в разных соотношениях предварительно откалиброванные препараты ДНК *L. iners* и *L. gasseri*. Результаты представлены в таблице 4.

**Таблица 4.** Условия и результаты экспериментов со «смешанными» образцами.

Соотношение двух в видов ДНК	Концентрация (ГЭ/реакцию)		Ct		
	<i>L. iners</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. iners</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>
0:1	0	750 000	0,0	21,9	21,0
0,04:1	30000	750 000	0,0	22,2	20,8
0,2:1	150000	750 000	26,7	22,1	20,4
1:1	750 000	750 000	22,3	22,4	19,7
1:0,2	750 000	150000	22,3	26,9	20,7
1:0,04	750 000	30000	22,4	0,0	21,0
1:0	750 000	0	22,7	0,0	21,5

Оказалось, что при амплификации двух видов одной парой праймеров количественная оценка каждого вида возможна только в том случае, если их концентрации в образце равны или

различаются незначительно. В случае смещения пропорции в сторону одного из видов более чем в 5 раз, количественно оценить можно только доминирующий вид. Если разница в концентрации компонентов составляла около порядка и больше, то менее концентрированный компонент не детектировался. Полученные результаты позволяют сделать несколько принципиальных выводов в отношении анализа проб, содержащих ДНК одновременно двух или более видов лактобактерий. Присутствие ДНК дополнительных видов лактобактерий не влияет на детекцию и количественное определение доминирующего вида. Наличие в образце ДНК двух видов лактобактерий приблизительно в равной концентрации не отражается не только на детекции этих видов, но и на их количественной оценке. Различие в концентрации ДНК двух видов более чем в 5 раз делает некорректной количественную оценку, а при больших различиях в концентрациях и невозможной детекцию и идентификацию минорных компонентов. Выявленные закономерности необходимо учитывать при интерпретации результатов исследования клинических образцов.

### **Разработка системы нормирования**

От правильно выбранного фактора нормирования зависит интерпретация данных, получаемых при использовании разработанных тест-систем. Широкое распространение имеют два подхода: нормирование по количеству ДНК человеческих клеток и по общему содержанию ДНК микроорганизмов. По результатам специальных экспериментов было установлено, что в случае изучения компонентов микробиот, показатель соотношения человеческих клеток и микроорганизмов нельзя признать адекватным критерием для количественной оценки содержания микроорганизмов.

Другой подход - обчислять все компоненты микробиоты как процент от общего содержания бактериальной ДНК в образце, позволяет преодолеть указанный недостаток. Общепринятой мишенью для определения «панбактериальной» ДНК методом ПЦР является ген *16S рPHK*. Мы отобрали 6 описанных в литературе пар праймеров и провели биоинформатический сравнительный анализ последовательностей гена *16S рPHK* для более чем 35 тысяч различных видов микроорганизмов для оценки сайтов связывания кандидатных праймеров. Кроме того, специфичность и эффективность всех пар праймеров сравнивали в реакциях амплификации с ДНК, выделенной из клинических урогенитальных мазков и чистой ДНК человека. По результатам экспериментов выбрана система, состоящая из праймеров E782Fm и E1061Rm.

Оценку аналитических характеристик «панбактериальной» тест-системы провели на десятикратных разведениях ДНК *L. gasseri*, с пересчетом на количество копий рибосомального оперона в геноме бактерии (Таблица 5). С помощью графика функции логарифмической регрессии рассчитано уравнение для количественной оценки содержания бактерий в образце.

**Таблица 5.** Аналитические характеристики панбактериальной системы.

Показатель*	E (%)	M (Ct)	R	R <sup>2</sup>	LOD (Копий/реакцию)
Полученное значение	96	-3,5283	0,99	0,99	300

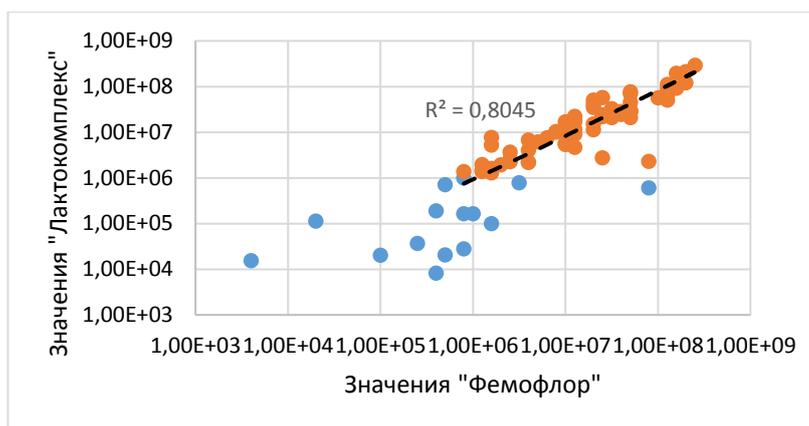
М – среднее количество циклов необходимое для увеличения количества ПЦР продукта на порядок, R – коэффициент корреляции, R<sup>2</sup> – коэффициент детерминации, E – эффективность ПЦР, LOD (*limit of detection*) – предел чувствительности (Bustin et al. 2009).

При оценке нормирования концентрации лактобактерий на общее содержание бактериальной ДНК в клинических пробах, в большинстве образцов выявлена прямая зависимость этих показателей. Таким образом, нормирование на общее содержание микробной ДНК является более адекватным подходом, потому что позволяет оценить процентное содержание отдельного вида бактерий в составе микробного сообщества и использовать этот показатель в качестве лактобактериального индекса для оценки влагилищного биоценоза.

### **Оценка состояния вагинальной микробиоты по лактобактериальному индексу**

Оценка состояния вагинальной микробиоты по соотношению общего количества лактобактерий к общему количеству бактериальной массы в практическом плане в России впервые была реализована в тест-системе «Фемофлор» («ДНК-Технология»). Особенности систем «Лактокомплекс» и «Фемофлор» состоят в том, что общее содержание лактобактерий в системе «Фемофлор» получают на основе анализа многокопийного гена 16S рРНК, тогда как в системе «Лактокомплекс» - на основе анализа однокопийного гена *rplK*. Мы провели сравнение результатов определения лактобактериального индекса, полученных системами «Лактокомплекс» и «Фемофлор». В первую очередь мы сравнили показатели определения бактериальной массы (Рисунок 5). Оказалось, что количественные оценки, полученные с помощью разных систем, хорошо коррелируют в диапазоне концентраций выше 10<sup>6</sup> копий мишени в микролитре образца. Коэффициент детерминации (R<sup>2</sup>) составил 0,8 что подтверждает высокую степень взаимосвязи полученных значений.

Разработка алгоритма расчета лактобактериального индекса и его верификация в сравнении с коммерческим аналогом «Фемофлор» дало нам основание использовать в дальнейшем классификацию клинических проб по критериям ООО «ДНК-Технология».



**Рисунок 5.** Сравнение количественной оценки содержания бактерий при помощи систем «Лактокомплекс» и «Фемофлор». Синим выделены образцы с концентрацией мишени менее  $10^6$  копий/мкл, оранжевым – более  $10^6$  копий/мкл.

### Изучение видового разнообразия лактобактерий в вагинальных микробиотах российских женщин

Тест-системы «Лактокомплекс» и «Лактоспектр\_grlK» были использованы для изучения видового состава доминирующих лактобактерий в вагинальных микробиотах российских женщин. Всего было исследовано 602 вагинальных мазка, взятых у женщин в возрасте от 14 до 66 лет, обратившихся в медицинские учреждения городов Москва, Королёв, Иваново и Чебоксары по разным причинам. Выборка включала в себя как женщин без видимых нарушений и жалоб, так и женщин с различными патологическими процессами в урогенитальной области.

Лактобактерии в достаточном количестве обнаружены в 96% проб, в остальных образцах они либо полностью отсутствовали, либо выявлялись в предельно низкой концентрации. При этом, во всех пробах без лактобактерий общее содержание бактерий было в пределах нормы, то есть отсутствие лактобактерий не было связано с качеством взятия и преаналитической обработки образца.

По полученным данным в 77% образцов доминировал только один вид лактобактерий, в 21% присутствовали два вида и только в 1,6% проб встречались три доминирующих вида лактобактерий (Таблица 6). Наиболее часто встречались виды *L. iners* и *L. crispatus*, 50 и 44,5 % проб, соответственно. *L. jenseni* встречался в 15% проб, при этом в 70% проб с наличием этого вида, он занимал минорную позицию в сочетании с *L. iners*. Реже остальных обнаруживался *L. gasseri* (6%), однако, если он присутствовал, то являлся доминирующим компонентом. На протяжении всего исследования найдена только 1 проба с доминированием *L. acidophilus*. Проб, в которых доминировали виды, типизирующиеся зондом PbLhe, в данном исследовании не обнаружено.

**Таблица 6.** Распространенность видов лактобактерий в исследованной выборке.

Виды <i>Lactobacillus</i>	Кол-во образцов	%
<i>L. iners</i>	203	33,7
<i>L. jensenii</i>	21	3,5
<i>L. gasseri</i>	29	4,8
<i>L. crispatus</i>	208	34,6
<i>L. iners</i> + <i>L. crispatus</i>	37	6,1
<i>L. iners</i> + <i>L. jensenii</i>	51	8,5
<i>L. iners</i> + <i>L. gasseri</i>	2	0,3
<i>L. crispatus</i> + <i>L. jensenii</i>	10	1,7
<i>L. crispatus</i> + <i>L. gasseri</i>	3	0,5
<i>L. iners</i> + <i>L. crispatus</i> + <i>L. jensenii</i>	8	1,3
<i>L. iners</i> + <i>L. crispatus</i> + <i>L. gasseri</i>	1	0,2
<i>L. crispatus</i> + <i>L. jensenii</i> + <i>L. gasseri</i>	1	0,2
<i>L. acidophilus</i>	1	0,2
<i>L. helveticus</i>	-	-
Не обнаружены	19	3,2
Всего	602	

Для сравнения, 202 пробы параллельно исследовали тест-системой «Лактоспектр\_tuf» (Таблица 7). Результаты по идентификации доминирующего вида совпали полностью, однако в отношении минорных компонентов обнаружены несовпадения. Во всех случаях несовпадения результатов идентификации минорных лактобактерий, разница в концентрации между минорным и доминирующим видом превышала 5-кратный предел, поэтому минорный компонент мог не детектироваться одной из систем. Обнаруженные расхождения не являются критичными, так как не затрагивают выявление доминирующих видов лактобактерий.

Помимо 4 основных видов *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. gasseri*, в 2-х образцах обнаружены *L. acidophilus* и *L. vaginalis*. *L. acidophilus* в одном образце занимал доминирующую позицию на фоне отсутствия каких либо других видов лактобактерий, в то время как *L. vaginalis* в другом образце являлся минорным компонентом. Каких-либо других видов лактобактерий в данном исследовании не обнаружено.

### **Корреляционный анализ доминирования различных видов лактобактерий в вагинальных микробиотах российских женщин**

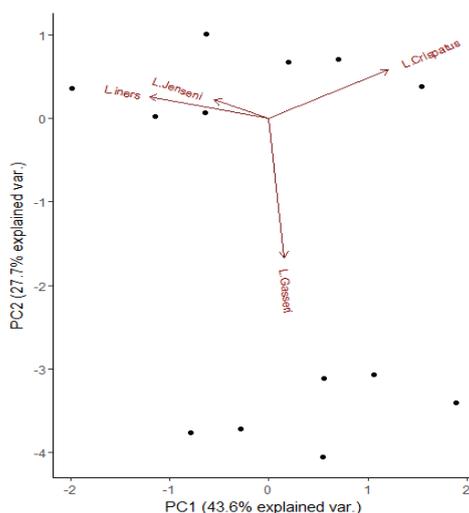
Поиск возможной корреляции между распространением доминантных видов лактобактерий и дополнительными показателями, описывающими исследованные образцы, проведена обработка полученных данных методами статистического анализа с использованием пакета программ R.

**Таблица 7.** Сравнение результатов видовой идентификации системами «Лактоспектр\_rplK» и «Лактоспектр\_tuf» на выборке из 202 образцов.

Название вида	Кол-во положительных образцов		Комментарий
	<i>rplK</i>	<i>tuf</i>	
<i>L. iners</i>	79	83	Во всех случаях несовпадений <i>L. iners</i> присутствовал в предельно низкой концентрации в сравнении с доминирующим видом.
<i>L. jensenii</i>	38	31	9 несовпадений. Во всех случаях несовпадений <i>L. jensenii</i> присутствовал в предельно низкой концентрации в сравнении с доминирующим видом.
<i>L. gasseri</i>	31	31	
<i>L. crispatus</i>	91	89	Во всех случаях несовпадений <i>L. crispatus</i> присутствовал в предельно низкой концентрации в сравнении с доминирующим видом.
<i>L. vaginalis</i>	не определяет	1	Обнаружен как минорный компонент на фоне <i>L. gasseri</i> .
<i>L. acidophilus</i>	1	не определяет	
<i>L. helveticus</i>	0	не определяет	Не обнаружен.
<i>L. johnsoni</i>	Не определяет	0	Не обнаружен.

В первую очередь определяли тип распределения данных общего содержания бактерий, полученных панбактериальной системой, методом Шапиро-Уилка. По результатам проверки, распределение отличалось от нормального ( $p\text{-value} = 2.15\text{E-}08$ ), что указывало на необходимость использовать только непараметрические методы.

Далее из выборки были исключены крайние значения с пониженной достоверностью, или так называемые «выбросы». Размер финальной выборки составил 568 проб. Полученную выборку анализировали с использованием метода главных компонент на наличие кластеризации по доминирующим видам лактобактерий (рис. 6).



**Рисунок 6.** Кластеризация образцов по встречаемости видов лактобактерий. По осям расположены рассчитанные значения для двух главных компонент (Comp.1 и Comp.2).

Как показано на рисунке 6, все 568 образцов разделились на 3 кластера: 2 кластера с доминированием *L. crispatus* или *L. gasseri*, и 1 кластер с доминированием *L. iners* или *L. jensenii*.

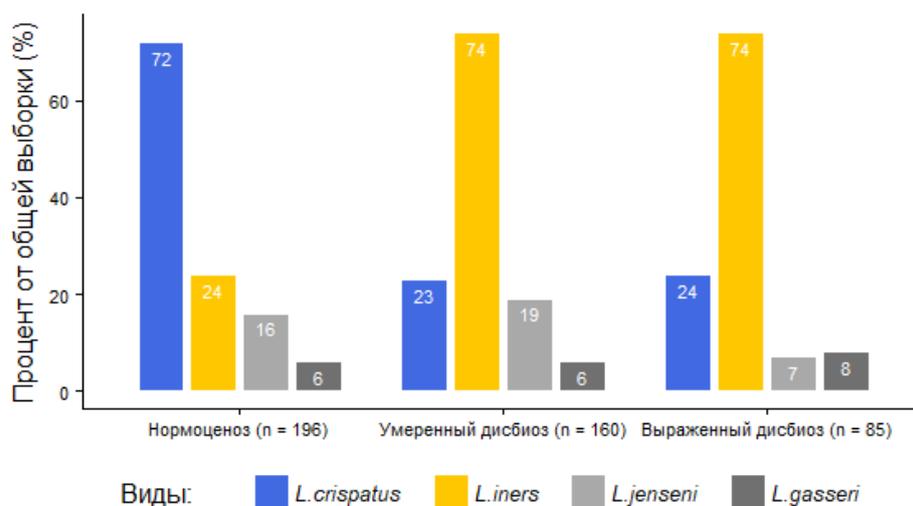
Анализ ассоциации видового разнообразия лактобактерий с возрастом и городом проживания пациента проводили на выборке из 568 образцов. Распространение видов лактобактерий не зависело от города проживания пациентки ( $p$ -value = 0,06 - 0,4). Среди пациенток в возрасте от 14 до 66 лет статистически значимой корреляции распространенности конкретного вида с возрастом не обнаружено ( $p$ -value = 0,6).

Для проведения анализа на ассоциацию видов лактобактерий с состоянием вагинальной микробиоты, отобраны пробы, в которых содержание бактерий превышало  $10^6$  копий/реакцию. Выборка, удовлетворяющая этому критерию, содержала 447 проб. Для всех отобранных проб рассчитано процентное содержание лактобактерий относительно общей бактериальной массы. На основании полученных данных пробы были классифицированы по 3-м категориям: нормоценоз, умеренный дисбиоз, выраженный дисбиоз. Взаимосвязь между встречаемостью видов лактобактерий и различным состоянием вагинального биоценоза анализировали с использованием метода Фишера в пакете программ R. Результаты анализа представлены на рисунке 7.

В образцах, отнесенных к категории нормоценоз, в качестве доминирующего вида преобладал *L. crispatus* ( $p$ -value  $< 2e-16$ ), тогда как доминирование *L. iners* ассоциировано с умеренным и выраженным дисбиозом ( $p$ -value  $< 2,2e-16$ ).

В настоящее время в клинической практике процентное содержание лактобактерий относительно общей бактериальной массы используется для диагностики вагинальных дисбиозов. Наши результаты коррелируют с представлением, что *L. crispatus* ассоциирован с

состоянием «нормоценоз», а *L. iners* – с состояниями «умеренный дисбиоз» и «выраженный дисбиоз».



**Рисунок 7.** Процент встречаемости видов лактобактерий в образцах с различным состоянием биоценоза.

Полученные в представленной работе данные крайне интересны с точки зрения клинической диагностики проблем урогенитального тракта женщин. В частности, присутствие в значительном количестве одного из видов лактобактерий отражает определенные клинические состояния вагинальной экосистемы, и, следовательно, может служить маркером этих состояний. Продолжение исследований в этом направлении позволит улучшить диагностику расстройств женской репродуктивной системы и откроет новые возможности для разработки пробиотиков на основе резидентных штаммов *L. crispatus*.

## ВЫВОДЫ

1. Предложена новая амплификационная мишень для детекции и идентификации вагинальных лактобактерий – ген *rplK*, кодирующий рибосомальный белок L11.
2. Впервые разработана тест-система, обеспечивающая корректное определение общего содержания вагинальных лактобактерий в пробе. Корректность работы системы обеспечивается тем, что в основе определения лежит амплификация гена *rplK*, который у всех потенциальных мишеней имеет одинаковое число копий.
3. На основе амплификации гена *rplK* разработана уникальная панель тест-систем, обеспечивающих как определение общего содержания, так и видовую идентификацию широкого круга лактобактерий, потенциально встречающихся в вагинальных микробиотах.
4. Биоразнообразие лактобактерий в вагинальных микробиотах женщин европейской части России ограничивается небольшим числом видов, среди которых доминируют *L. crispatus*,

*L. iners*, *L. gasseri* и *L. jensenii*. Другие виды лактобактерий встречаются крайне редко и обычно являются минорными компонентами микробиоты.

5. Вагинальные микробиоты российских женщин могут быть классифицированы на 3 кластера с доминированием *L. crispatus*, *L. iners*, или *L. gasseri*. Доминирование *L. crispatus* ассоциировано с нормальной микрофлорой, доминирование *L. iners* с вагинальным дисбиозом, выражающимся сниженным содержанием лактобактерий.
6. Распространение *L. jensenii* коррелирует с доминированием *L. iners*.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах:

1. Demkin, V.V., Characterization of vaginal Lactobacillus species by rplK -based multiplex qPCR in Russian women / V.V. Demkin, **S.I. Koshechkin** // Anaerobe. – 2017. – Vol. 47 – P. 1 – 7. Impact Factor 2,80
2. Demkin, V.V. A novel real-time PCR assay for highly specific detection and quantification of vaginal lactobacilli / V.V. Demkin, **S.I. Koshechkin**, A. Slesarev // Mol. Cell. Probes. – 2017. – Vol. 32. – P. 33 – 39. Impact Factor 1,61. Цит Scopus = 2.

### Тезисы всероссийских и международных конференций:

1. **Кошечкин, С.И.** Видовое разнообразие лактобактерий в вагинальных мазках беременных женщин г. Москвы / С.И. Кошечкин, Н.В. Иванова, Н.С. Духанина, Г.Н. Заруцкая, Ф.А. Багдалова, Ф.Г. Медетханова, Е.В. Навбатникова, В.В. Демкин // В книге: Молекулярная диагностика - 2017 Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Под ред. В.И. Покровского. – 2017. – Т. 1. – С.390 – 391.
2. **Кошечкин, С.И.** Видовое разнообразие лактобактерий в вагинальных мазках женщин г. Иваново / С.И. Кошечкин, Ж.Г. Морева, В.В. Демкин // Актуальные вопросы и перспективы развития медицины. Выпуск III. Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции (11 мая 2016 г). Омск. – 2016. – С. 65 – 67.
3. **Кошечкин, С.И.** Видовое разнообразие лактобактерий в вагинальных микробиотах женщин России / С.И. Кошечкин, В.В. Демкин // Материалы конгресса «X ЮБИЛЕЙНЫЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС ПО РЕПРОДУКТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ» – М., 2016 – С. 55 - 56.
4. **Кошечкин, С.И.** Анализ видового состава лактобактерий в микробиотах влагалища у женщин репродуктивного возраста методом ПЦР в реальном времени / С.И. Кошечкин, В.П. Карлина, Р.А. Кузьмичева, В.В. Демкин// Молекулярная диагностика. Сб. трудов колл.авт., под ред. В.И. Покровского. – Т. 1. – М.: ООО "Издательство МБА", 2014 – С. 181 – 182.
5. Демкин, В.В. Структура патогенной и условно-патогенной микрофлоры половой сферы по результатам обследования женщин Московского региона / В.В. Демкин, **С.И. Кошечкин** // Инфекционные болезни, Материалы V Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням, г.Москва. – 2013. – Т. 11., приложение №1. – С. 120 – 121.