

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи

Исламова Карина Ильдаровна

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ
SAMPYLOBACTER SPP. В ТКАНЯХ ТОЛСТОЙ КИШКИ ПРИ
НЕСПЕЦИФИЧЕСКОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ**

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор



Мавзютов А.Р.

Уфа – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	3
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Представление о <i>Campylobacter spp.</i>	6
1.2. Роль <i>Campylobacter spp.</i> при воспалительных заболеваниях кишечника	8
1.3. Участие микробиоты кишечника при развитии ВЗК	10
1.4. Эпидемиология и этиология НЯК	12
1.5. Участие <i>Campylobacter spp.</i> при патологических процессах НЯК	15
1.6. Клинико-лабораторные методы исследования <i>Campylobacter spp.</i>	21
1.7. Диагностика НЯКа у пациентов	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Получение и парафинизация материала	30
2.2. Выделение ДНК из материала и депарафинизация	33
2.3. Выделение ДНК с использованием магнитных частиц	37
2.4. Проведение ПЦР в режиме реального времени	40
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
3.1. Получение ткани, фиксированной в формалин, и заключенная в парафин	43
3.2. Выделение ДНК с помощью магнитных частиц	44
3.3. Подбор условий для амплификации ДНК	45
3.4. Проведение ПЦР RealTime	46
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	48
ВЫВОДЫ	49
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	50

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БК – болезнь Крона

НЯК – неспецифический язвенный колит

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ВЗК – воспалительное заболевание кишечника

ОКИ – острая кишечная инфекция

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РТ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ОКИ– острые кишечные инфекции

ИФА–иммуноферментный анализ

ЯК–язвенный колит

СJI– *Campylobacter jejuni*

НК–нуклеиновые кислоты

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Неспецифический язвенный колит – заболевание, представляющее собой диффузное воспаление слизистой оболочки кишечника, ограниченное лишь пределами толстой кишки с поражениями прямой кишки и с образованием множественных язв.

Эпидемиологическая картина язвенного колита в целом по России неизвестна. Распространенность в мире 100-350 случаев на 150 тысяч населения. Ежегодный прирост пациентов в мире составляет около 30-50 случаев на 200 тысяч человек. Заболевание встречается во всех возрастных группах, но его основной пик приходится на 18-50 лет. Смертность от воспалительных заболеваний кишечника, включая неспецифический язвенный колит, составляет 10 случаев на 500 тыс. человек в мире и 50 случаев на 1 миллион человек в России. В России в большинстве случаев диагноз ставится с опозданием, через несколько лет после появления первых симптомов заболевания.

Данная болезнь несет в себе серьезные проблемы для колопроктологов и гастроэнтерологов. Он занимает одно из главных мест среди желудочно-кишечных заболеваний по причине своей тяжести, частоте осложнений и смертности. Причины язвенного колита точно не определены и являются предметом бесконечных исследований и предметом многочисленных дискуссий.

Существуют косвенные доказательства того, что бактерии, проникающие в ткани толстой кишки, могут иметь отношение к возбуждению заболевания. Не исключается возможность участия *Campylobacter spp.*, так как они инвазивны и поражают те же органы желудочно-кишечного тракта, что и неспецифический язвенный колит.

Данная тема детерминирована необходимостью расширения теоретическим и/или эмпирическим путем доказательной базы влияния бактерий *Campylobacter spp.* на заболеваемость неспецифическим язвенным

колитом как одним из самых распространенных форм болезней ЖКТ, "подкашивающим" молодое, экономически активное население, а также выявлением основных причин неуклонного роста заболеваемости, как в мире, так и в России.

Цель работы: Сравнительная оценка методов диагностики неспецифического язвенного колита и оптимизация способов детекции бактерий *Campylobacter spp.*

Задачи исследования:

1. Сбор образцов ткани и/или парафиновых блоков, полученных в процессе колоноскопии пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.
2. Выделение, очистка и формирование коллекции ДНК из образцов ткани и/или парафиновых блоков для последующего молекулярно-генетического тестирования.
3. Сравнительная оценка методов диагностики НЯК
4. Оптимизация способов детекции бактерий *Campylobacter spp.*

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. впервые описан Вероном и Чателайном в 1973 г., представляет собой грамотрицательные неспорообразующие палочки изогнутой или спиральной формы, с противоположным расположением жгутиками на одном или двух концах, которое обуславливает нестандартную штопорообразную подвижность бактериальной клетки.

Делится на шесть таксонов:

1. *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*,
2. *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei*,
3. *Campylobacter coli*,
4. *Campylobacter lari*,
5. *Campylobacter upsaliensis*
6. *Campylobacter helveticus*

Они образуют группу на генном уровне схожую с термофильными кампилобактериями с хорошей температурой роста +42 °С, владеющих возможностью инфицировать человека и теплокровных животных. Основная часть видов семейства *Campylobacteriaceae* характеризуется широкой распространенностью и обилием источников выделения, наибольшее значение в появлении пищевых токсикоинфекции имеют *C. jejuni* и *C. coli*

О пищеварительной кишечной форме кампилобактериоза у свиней в первый раз докладывал Дойл в 1944 году, подчеркнув микроаэрофильных кампилобактерий из слизистой оболочки кишечного тракта животных с подтвержденной медицинской дизентерии. Наибольшее количество данных микробов находилось в слепой и ободочной кишках, где возбудитель размещался группами и поодиночно как в просвете кишечного тракта, так и в толще слизистой оболочки. В кое-каких случаях встречались *Campylobacter*

еще внутри эпителиальных клеток, собственно, что может указывать о внедрение данных микробов вглубь тканей.

Кампилобактерии — это тонкие, спирально изогнутые, не образующие спор и капсул, грамотрицательные палочки с одним (подвиды *fetus*, *venerealis*, *fecalis* и *sputorum*), двумя (виды *coli*, *lari* и *jejuni*) или 4-5 (*pyloridis*) полярно расположенными жгутиками. Форма бактерий спиральная с одним или несколькими завитками, изогнутые в виде запятой, латинской буквы Sv, «крыла чайки». С увеличением числа пассажей на средах, количество завитков увеличивается.

С помощью электронных фотографий выяснилось, что идет колебания величины отдельных клеток кампилобактеров: ширина 0,25-0,5 мкм, длина 0,9-3,0 мкм, длина жгутиков 1,4-3,6 мкм. При культивировании более 48-72 часов образуют кокковидные формы (*C. jejuni*) и спирилловидные формы (*C. venerealis*).

Клеточная стенка микробов состоит из трехслойной наружной мембраны, прилегающей к ней периплазматического пространства, содержащего тонкий пептидогликановый слой, и трехслойную цитоплазматическую мембрану. Вдоль клеточной стены размещена широкая непроницаемая полоса, имеющая густо упакованные частички рибосом. В центре клетки лежит электронно-прозрачная зона нуклеоида, заполненная сетью тонких фибриллярных нитей ДНК. В клеточной стене находятся только галактоза и глюкоза или же галактоза, глюкоза и манноза.

Длительное время кампилобактеры не могли культивировать, однако в 1975 г. британский микробиолог Скирроу сумел культивировать *in vitro* с использованием кровяного агара с антибиотиками для изоляции и репродукции *C. jejuni*. Это изобретение стало новым шагом в исследовании биологических качеств кампилобактеров и обеспечило открытие новых их видов.

Культуральные свойства кампилобактеров обусловлены их отношением к кислороду воздуха. Патогенные для человека виды являются капнофилами (необходимая концентрация углекислого газа 10-15 %) и микроаэрофилами

(необходимая концентрация углекислого газа 3-15 %). Некоторые другие виды кампилобактеров могут также расти и в аэробных условиях (21 % O₂), другие, например *C. fetus subsp. fetus*, способны к росту в анаэробных условиях. Поэтому приблизительный состав газовой среды содержит 5 % кислорода, 10 % углекислого газа и 85 % азота. бактериями

Бактерии рода *Campylobacter* способны взаимодействовать по принципу комменсализма или находится в консорциуме кишечного микробиома с другими патогенными микроорганизмами. Из-за нахождения бактерий в кишечнике вместе с другими вызывает спутанность в диагностике, так как происходит возникновение ложноположительного диагноза.

Находясь в микробиоте человека, бактерии кампилобактер, могут вызывать вторичные инфекции на основе болезней ВЗК и снижению иммунитета. В кишечнике человека идеальные условия для этих бактерий, а снижение иммунитета дает легкость проникновения в эпителиальные клетки, где есть анаэробная среда.

1.2 Роль *Campylobacter spp.* при воспалительных заболеваниях кишечника

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – это группа самостоятельных хронических воспалительных состояний кишечника человека. Две главные составляющие ВЗК – болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК), каждая из которых имеет как наслаивающиеся друг на друга, так и самостоятельные клинические и патологические черты. Причиной воспаления служат клеточно-опосредованные реакции в слизистой оболочке. Точная причина ВЗК остается неясной, однако результаты исследований позволяют предполагать, что пусковым фактором ненормальной иммунной реакции служит нормальная кишечная микрофлора у пациентов.

При ВЗК слизистая оболочка кишечного тракта может быть пронизана иммунными клетками, еще и Т-лимфоцитами. Таким образом, ученые G.

Bisping, N. Lügering и Т. Kucharzik установили, что Т-клетки присутствуют в активированном состоянии у больных с ВЗК в том числе и на этапе падения заболевания. При активации пищеварительных эпителиальных клеток во время начальной стадии воспалительного процесса макрофаги и Т-клетки выделяют большое количество провоспалительных цитокинов, которые способны активировать иные типы воспалительных клеток. Неизменная микрофлора зрелого организма может изменяться при контакте с патогенными и непатогенными микробами, при конкретном виде жизни, всевозможных диетах. Наличие изменений в микрофлоре кишечного тракта кишечника с возрастом, которые предполагают снижение бифидобактерий в старшей возрастной группе по сопоставлению с больше юными и увеличение разнообразия видов бактерий.

Воспалительные заболевания ЖКТ, вызванные бактериями рода *Campylobacter*, являются самыми распространенными заболеваниями с пищевым путем передачи. Микроорганизмы *Campylobacter spp.* известны более 85 лет как возбудители заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц, в 1966 г. они были выделены от больных людей с клиническими признаками гастроэнтерита. В результате установленной взаимосвязи между кишечными инфекциями и заболеваниями человека экспертный комитет ВОЗ в 1985 г. включил этот микроорганизм в официальный перечень возбудителей пищевых токсических инфекций. В настоящее время признано, что заболевание людей кампилобактериозом вызывают бактерии *Campylobacter jejuni*.

Внекишечные инфекции кампилобактериоза в основном включают бактериемию, гемолитический мочевого синдром, перитонит и очаговые инфекции. В популяциях, которые не вызывают выраженного иммунного ответа, трудно лечить диарейные заболевания и бактериемию с функционально активным состоянием инфекций. Кампилобактериоз с меньшей вероятностью может привести к летальному исходу, но уровень смертности от этой инфекции может быть недооценен, поскольку он связан с другими этиологическими факторами. Частота обнаружения бактерий *Campylobacter* у видов сельскохозяйственных животных, чаще всего у птиц, а также у сырья,

полученного из них, указывает на значительное распространение этих микроорганизмов и возможное загрязнение пищевых продуктов. В результате плохо обработанные термически продукты вызывают инфекцию.

Важным патогенетическим звеном ВЗК является повышенная проницаемость эпителиального барьера и внедрение бактерий в стенку кишки, что основывается на выявлении повышения концентрации ДНК бактерий в биоптатах оболочки кишки у пациентов с ВЗК и еще большего его увеличения по мере нарастания активности процесса.

Не исключается участие бактерий рода *Campylobacter spp.* в развитие воспалительных заболеваний кишечника, потому что они инвазионные, проникающие в ткани, которые уже были воспалены из-за действия других бактерий и иммунной системы, уничтожающей эти бактерии. Аутоимунные реакции – процесс, который запущен неизвестной причиной и этой причиной могут быть *Campylobacter*, которые углубляются в ткани кишечника.

1.3 Участие микробиоты кишечника при развитии ВЗК

Воспалительные заболевания кишечника, включая язвенный колит и болезнь Крона, характеризуются неконтролируемым воспалительным процессом в кишечнике. Хотя ежегодно проводится много исследований для изучения ВЗК, этиология и патогенез этих заболеваний до сих пор полностью не изучены. Согласно современным представлениям, заболевание возникает в результате нарушения взаимодействия факторов окружающей среды и иммунной системы организма на фоне существующей генетической предрасположенности. Одним из значимых факторов, влияющих на развитие ВЗК, является кишечная микробиота. В кишечнике человека обитают в среднем около 110 триллионов бактериальных клеток, что превышает в 15 раз количество собственных клеток организма и общий вес бактериальных клеток составляет 1,5-2,0 кг.

Кишечная микробиота стимулирует развитие иммунитета у детей, а также поддерживает иммунологический гомеостаз на протяжении всей жизни. На формирование микробиоты влияют такие факторы, как окружающая среда, питание и антибактериальные препараты человека.

Ранние исследования микробиоты у пациентов с ВЗК были направлены на обнаружение какой-то одной бактерии, которая могла быть возбудителем заболевания. В настоящее время, с учетом научных исследований, можно сказать, что причиной возникновения ВЗК является нарушение всей бактериальной экосистемы кишечника.

Достоверных фактов, указывающих, что какой-то один определенный микроорганизм участвует в развитии ВЗК, не существует. Для данной группы заболеваний более характерен общий дисбаланс микрофлоры кишечника, с течением увеличения провоспалительных микроорганизмов и уменьшения защитных противовоспалительных.

Таким образом микробиота кишечника человека имеет главную роль в поддержании иммунной системы от нежелательных болезней и от образа жизни, экологии и психоэмоционального состояния зависит здоровье человека. ВЗК остается одной из актуальнейших проблем в медицине, так как играют множество факторов в развитии заболеваний и не всегда ставится точный диагноз, и анамнез в следствии чего назначается неправильное лечение, которое может либо навредить, либо привести к летальному исходу.

1.4 Эпидемиология и этиология НЯК

НЯК – хроническое рецидивирующее заболевание толстой кишки, с тяжелым внутренним язвенно-воспалительным поражением ее слизистой оболочки с развитием местных и системных осложнений.

Распространённость язвенного колита в странах мира отличается разнообразием и чаще всего, практика показывает на возрастающее увеличение распространенности данного заболевания. ЯК вместе с болезнью Крона

включены в группу «воспалительных болезней кишечника» неизвестного происхождения.

В России в большинстве случаев диагноз ставится через несколько лет от момента появления первых симптомов и классифицируется:

- I. По форме течения болезни.
- II. По месту нахождения.
- III. По тяжести клинических проявлений и активности заболевания.
- IV. По ответу на стероиды.

Также тяжесть течения НЯК оценивается по критериям Трулова и Виттса. Может быть использована система оценки тяжести клиники Мейо. Индекс Мейо = частота стула + наличие ректальных кровотечений + данные эндоскопического исследования + общее заключение врача.

Частота стула, ректальное кровотечение, эндоскопическая картина от 0 до 3х баллов.

Общая клиническая характеристика опирается на заключения врача по трем критериям: ежедневные сообщения пациента об ощущениях в области живота, общее самочувствие пациента и характеристика объективного статуса больного также по баллам. В конце проводят толкование индекса Мейо по баллам от 0 до 12.

Воспаление различных отделов толстой кишки определяется морфологически. Слизистая оболочка полна крови, опухла, покрыта язвами, хотя они имеют круглую форму разных размеров. Микроскопические изменения характеризуются инфильтрацией собственной слизистой оболочки плазматическими клетками, эозинофилами, лимфоцитами, тучными клетками и нейтрофилами.

Большинство ученых считают, что генетические, иммунологические и бактериальные механизмы участвуют в патогенезе. Обсуждается участие микрофлоры кишечника в патогенезе ЯК. У людей с ВЗК соотношение нормальных и патогенных кишечных бактерий изменяется в сторону

патогенных. Важно изменить метаболизм или вирулентные свойства комменсальных бактерий.

Рассматривается наследственная предрасположенность к развитию воспалительного процесса в слизистой оболочке толстой кишки в ответ на обсеменение её поверхности микроорганизмами и вирусами, а также контактного воздействия продуктов питания. Данное мнение основано на сочетании НЯК с другими аутоиммунными процессами.

Были проведены исследования по определению соотношения Т-лимфоцитов в слизистой оболочке кишки, что указывает на нарушение иммунной системы взаимодействия активированных CD4 и CD8- лимфоцитов. В нормальной микробиоте кишечника эпителиальные клетки стимулируют преимущественно CD8-Т-лимфоциты, в то время как при НЯК они активируют только CD4-лимфоциты, что сопровождается выделением лимфокинов и стимуляцией макрофагов в системе комплемента.

Внекишечные симптомы НЯК выявляются у 25% больных. К ним относятся узловатая эритема, гломерулонефрит, гангренозная пиодермия, воспалительные заболевания глаз, артриты, спондилит, нарушения функции дыхательной системы, миозиты, и другие патологические процессы.

Воспаление при ЯК затрагивает слизистую оболочку и подслизистый слой, также характерно наличие видимой границы между здоровой и пораженной тканью. На ранних стадиях болезни слизистая оболочка интенсивно красная, на поверхности покрыта мелкими гранулами, легко ранима, нормальный сосудистый рисунок исчезает, часто определяются рассеянные геморрагические элементы. Мышечный слой поражается только при тяжелом течении и для него характерны крупные изъязвления слизистой с обильным гнойным отделяемым. Островки относительно сохранной или воспаленной слизистой выступают над изъязвленной поверхностью, абсцессы не формируются.

Диарея различной выраженности и продолжительности сменяется периодами отсутствия симптомов. Болезнь начинается неожиданно, с

появления неотложных позывов на дефекацию, схваткообразной боли внизу живота, примеси крови и слизи в выделениях. В части случаев симптомы обострения развиваются на почве дополнительной инфекции в сочетании с амебиазом и шигеллезом.

При язвенном поражении ободочного отдела дефекация может быть нормальной, либо плотной и сухой, однако отмечаются выделения слизи с кровью и лейкоцитами. Частые проявления отсутствуют или слабо выражены. При более распространенном язвенном процессе стул становится неоформленным, с частотой больше 10 раз в день, нередко – с выраженной схваткообразной болью и мучительными тянущими болями, продолжающимися в основном ночью. Испражнения могут быть разной консистенции: водянистыми, содержать слизь или полностью состоять из крови и гноя.

Токсический колит выявляется внезапным появлением тяжелой диареи с повышенной температурой до 40° С, болями в животе, признаков перитонита и выраженной интоксикации.

К повторяющимся проявлениям, которые наиболее характерны для распространенного колита, относят общую слабость, лихорадку, анемию, анорексию, снижению массы тела. Внекишечные симптомы ВЗК (в особенности, поражения суставов и кожи) наиболее характерны для случаев с системными проявлениями.

У больных с ЯК рак толстой кишки встречается довольно чаще, особенно при длительном течении заболевания до 10 лет и больше. Неблагоприятными особенностями являются злокачественные малоизученные формы, множественное и быстрое образование вторичных очагов опухолевого роста, обширность поражения толстой кишки.

Происхождение неспецифического язвенного колита точно не выявлены и основываются лишь на предположениях ученых и врачей, чем вызывает нескончаемые споры для обсуждений и экспериментов. НЯК может протекать бессимптомно много лет и перерасти в хроническую форму или привести к раку толстой кишки. В слизистой толстой кишки визуализируется расширение

капилляров и кровоизлияние, образование язв и формирование крипт-абсцессов. На ранних этапах болезнь легко спутать с другими кишечными заболеваниями и спустя определенное время, когда у пациента присоединяются жалобы на наличие примеси крови в стуле, кратность которого увеличивается до 10 и больше раз в сутки, служит основанием для проведения метода эндоскопического обследования прямой кишки и дистального отдела сигмовидной кишки путем осмотра их внутренней поверхности с помощью ректороманоскопа, введенного через задний проход с биопсией.

Язвенный колит впервые был описан в 1842 году в докладе ученого К. Рокитанского «О катаральном воспалении кишечника», причины его возникновения до сих пор остаются неизвестными, что не может не сказаться на эффективности его лечения. Болезнь поражает две возрастные группы населения, первая группа людей от 20-40 лет, вторая – от 60 до 80 лет.

1.5 Участие *Campylobacter spp.* при патологических процессах НЯК

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), болезнь Крона и язвенный колит — это клеточные заболевания, которые характеризуются хроническим возобновляемым периодическим воспалением кишечного тракта. Патогенез ВЗК включает в себя сложное взаимодействие между микрофлорой кишечника, генетическими и иммунными факторами хозяина и стимулами окружающей среды. Эпидемиологический анализ показал, что острый бактериальный энтерит является одним из факторов, которые могут подстрекать или усугублять ВЗК у восприимчивых людей. Недавние экспериментальные данные указывают на то, что *C. jejuni* может позволить транслокацию нормальной неинвазивной микрофлоры с помощью новых процессов, которые затрагивают эпителиальные раны липидов. Это нарушение кишечной барьерной функции может, в свою очередь, привести к воспалению кишечника при хронических воспалительных реакциях у восприимчивых людей. Понимание взаимодействия между кишечными патогенами, эпителием

хозяина и кишечной микрофлорой улучшит наше понимание процессов заболевания, которые могут инициировать и / или усугубить воспаление кишечника у пациентов с ВЗК, и даст толчок для разработки новых терапевтических подходов для лечения ВЗК, более 1 на 1000 человек в развитых странах страдают от воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), болезни Крона (БК) и язвенного колита (ЯК). Эти заболевания характеризуются хроническим рецидивирующим воспалением кишечного тракта и наличием активированных Т-лимфоцитов. При БК эти активированные Т-клетки в основном принадлежат к подмножествам Th1 и Th17, тогда как Th-клетки Th2 и природные киллеры преобладают в ЯК.

Как и в случае многих хронических заболеваний, патогенез ВЗК включает в себя совокупное взаимодействие многих переменных; к ним относятся иммунитет хозяина и генетическая восприимчивость, микрофлора кишечника и факторы окружающей среды. Сложность этих взаимодействий согласуется с гетерогенными клиническими проявлениями ВЗК и неуниверсальной эффективностью доступных в настоящее время терапевтических средств. Это подчеркивает огромные проблемы, с которыми сталкиваются клиницисты и исследователи при выявлении причин ВЗК. Несмотря на его многофакторное происхождение, накапливающиеся данные неизменно указывают на то, что кишечные микроорганизмы распространяются по всему миру при ВЗК.

Все большее число исследований показывают, что хроническое воспаление при ВЗК обусловлено неуместными и чрезмерными иммунными реакциями слизистой оболочки на микрофлору кишечника, но механизмы, по которым это происходит, остаются неясными. Воспаление происходит чаще в областях кишечника, которые колонизированы самой высокой плотностью бактерий, и утечка фекального потока или лечение антибиотиками могут ослабить воспаление у некоторых пациентов с ВЗК. Эти пациенты также проявляют преувеличенные иммунные ответы на собственные кишечные бактериальные антигены, что указывает на потерю иммунологической толерантности к микрофлоре кишечника.

Кишечные патогенные микроорганизмы могут повредить эпителий и нарушить кишечную барьерную функцию посредством ряда патологических механизмов, которые включают в себя индукцию гибели клеток-хозяев, нацеливание на плотные эпителиальные и адгезивные соединения, а также вызывающее воспаление повреждение. Что касается *C. jejuni*, повреждение клеток, по-видимому, в значительной степени связано с цитотоксическими эффектами и / или инвазией клеток хозяина. Согласно анализу последовательности генома, единственный известный токсин, продуцируемый *C. jejuni*, представляет собой токсин цито-летальной кислоты (CDT), ДНКазоподобный токсин, продуцируемый несколькими видами бактерий. Этот токсин вызывает остановку клеточного цикла и, в конечном итоге, апоптотическую гибель лимфоцитов и моноцитов и неапоптотическую гибель эндотелиальных клеток. Последние данные указывают на то, что *C. jejuni* вызывает неапоптотическую гибель (т.е. онкоз) эпителиальных клеток кишечника человека независимо от ВЗК.

Инвазия слизистой оболочки, по-видимому, является одним из основных механизмов, посредством которых *C. jejuni* вызывает повреждение кишечника. Инвазивная способность *C. jejuni* зависит от штамма и типа клеток-хозяев, а инвазия связана с неапоптотической гибелью эпителиальных клеток толстой кишки человека. Во многих случаях гибель клеток (в результате микробной или воспалительной стимуляции или воздействия лекарств) может привести к потере барьерной функции кишечника. Некоторые исследования показали, что инвазия эпителия некоторыми штаммами *C. jejuni* связана с повышенной проницаемостью эпителия. Тем не менее, еще предстоит окончательно определить, является ли дисфункция барьера следствием повреждения эпителия, связанного с повышенной гибелью клеток, или же это связано с нацеливанием на плотные эпителиальные соединения, как это недавно наблюдалось для этого патогена.

Два недавних исследования продемонстрировали, что *C. jejuni*-обусловленное нарушение структуры и функции эпителия кишечника приводит

к транслокации неинвазивных бактерий через эпителий. В этих двух исследованиях использовались разные штаммы *C. jejuni* для оценки *C. jejuni*-опосредованной транслокации неинвазивной кишечной палочки. В соответствии со способностью *C. jejuni* взаимодействовать с эпителиальными клетками в зависимости от штамма, наблюдались два различных механизма бактериальной транслокации. А именно, *C. jejuni* RM1221 индуцировал транслокацию неинвазивных бактерий через эпителий через парацеллюлярный путь, тогда как *C. jejuni* 81–176 индуцировал бактериальную транслокацию через трансклеточный механизм.

Campylobacter jejunia и *Campylobacter coliare* которые вызывают воспаление, иногда кровотечение, диарею и боль в животе. Кампилобактерии составляет до 20% от острой бациллярной диареи, но часто не обнаруживается при обычной культуре кала. Основной причиной приступа является рак. Правильный диагноз основывается на клинических симптомах, истории болезни и культуре стула, при эндоскопии. В то же время, у детей с неспецифическим эндоскопическим проявлением эритемы и мелких язв, которые трудно отличить от болезни Крона или язвенного колита в некоторых случаях. Важно отметить, что в большинстве случаев невозможно различить различные патогены на основе результатов эндоскопического исследования, поскольку колит, вызванный шигеллой, сальмонеллой, кампилобактерией и кишечной палочкой, вызывает один и тот же тип повреждения слизистой оболочки.

Campylobacter jejuni является наиболее распространенной причиной острой бактериальной диареи. Кампилобактерная диарея обычно сопровождается лихорадкой и болями в животе, обычно водянистая. Также могут присутствовать тошнота, рвота, головная боль и миалгия. Тенезм является общей чертой. У большинства пациентов с диареей *Campylobacter* есть некоторый компонент сегментарного колита, обычно начинающийся в тонкой кишке и прогрессирующий дистально до слепой кишки и толстой кишки. *C. jejuni* является редкой причиной панколита. Внебольничный колит может быть

вызван *C. jejuni* или другими кишечными патогенами, например, *Shigella*, *Entamoeba*, *Yersinia*, *Escherichia coli* 0157: H7, *Clostridium difficile*, колитом, ишемическим колитом или идиопатическим язвенным колитом.

ЯК является основной формой воспалительных заболеваний кишечника, характеризующихся хроническим рецидивом и повторном образовании язв на стенках толстой кишки. Симптоматика при ЯК включает кровавую диарею, боль в животе. Патогенез включает в себя сложное взаимодействие нерегулируемого иммунного ответа на неизвестную активность окружающей среды или нарушение микрофлоры в толстой кишке у восприимчивого хозяина. Появляется все больше достоверных исследований сообщающих о повышенном риске возникновения и обострения ВЗК после желудочно-кишечных (ЖКТ) инфекций энтеропатогенными бактериями, помимо этого, было показано, что заражение некоторыми патогенами ЖКТ, такими как *Clostridium difficile* (*C. diff*), приводит к худшим результатам у пациентов с ВЗК.

Campylobacter jejuni (*C. jejuni*) является распространенной причиной ЖКТ-инфекции в Соединенных Штатах, которая передается людям через загрязненную пищу и воду. Симптомы гастроэнтерита *Campylobacter* варьируются от легкой, водянистой диареи до тяжелой дизентерии. Была исследована роль инфекции *Campylobacter* в патогенезе ВЗК. В популяционном когортном исследовании с 15-летним наблюдением было выявлено, что пациенты с гастроэнтеритом *Campylobacter* имеют повышенный риск развития ВЗК. Инфекция *Campylobacter jejuni* также часто отмечается у пациентов с ЯК. Однако влияние СЛ на клиническое течение ЯК систематически не изучалось.

Помимо заболеваний пародонта и диареи, в последнее время *Campylobacter concisus* был связан с воспалительным заболеванием кишечника (ВЗК). ВЗК является хроническим воспалительным состоянием желудочно-кишечного тракта, с двумя основными формами болезни Крона (БК) и язвенный колит (ЯК). Может возникнуть воспаление в БК где-нибудь вдоль желудочно-кишечного тракта, однако в Калифорнии воспаление часто возникает в толстой кишке и прямой кишке.

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что *C. jejuni* нарушает структуру и функцию эпителия кишечника и тем самым позволяет транслокации просветного материала, включая резидентные кишечные бактерии, в субэпителиальный компартмент. Это, в свою очередь приводит к воспалению кишечника.

Последние данные показывают, что *C. jejuni* вызывает транслокацию неинвазивной кишечной палочки с помощью двух различных механизмов, один из которых включает разрушение плотных эпителиальных соединений и усиление параклеточного транспорта бактерий, а другой - увеличение трансцеллюлярного транспорта через эпителиальные липидные рафты. Хотя эти исследования предполагают гипотетические механизмы, с помощью которых *C. jejuni* может способствовать патогенезу неспецифического язвенного колита, многие вопросы остаются без ответа. Несмотря на это, постоянно растущее количество информации, основанных на больших исследованиях на людях, указывает на то, что *C. jejuni* способствует развитию и / или обострению симптомов у пациентов с ВЗК и хронического язвенного колита. Большее изучение эпителиальных реакций на *C. jejuni* может дать лучшее понимание механизмов, ответственные за инициацию и / или рецидив кишечного воспаления у пациентов с ВЗК. В свою очередь, выявление механизмов, посредством которых эти ответы могут нарушать кишечный гомеостаз микроорганизмов-хозяев, поможет выявить новые терапевтические мишени при ВЗК, тем самым улучшить эффективность лечения данного заболевания.

1.6 Клинико-лабораторные методы исследования *Campylobacter spp.*

Для лабораторной диагностики кампилобактериозного заболевания кишечника, кроме основного бактериологического метода, могут быть использованы и другие методы.

Бактериоскопический метод основан на обнаружении в окрашенном препарате микроорганизмов с характерной морфологией или в сочетании с

подвижностью таких как препарат "раздавленная капля" микроскопии. Бактериоскопический метод является положительным при обсемененности 10^5 КОЕ в 1 мл материала и имеет только дополнительное значение в диагностике кампилобактеров.

Серодиагностика при кампилобактериозе имеет также дополнительное значение и может быть проведена при отсутствии выделения возбудителя, при эпидемиологических исследованиях и изучении патогенеза. Исследование сывороток при кампилобактериозной инфекции не несет такого большого диагностического значения как при многих других кишечных заболеваниях, поскольку отчетливое увеличение титров антител наблюдается малого количества больных.

Для ускоренной индикации предполагалось использовать иммунологические реакции, такие как реакция коагуляции или ИФА. Не могут широко использоваться в практических лабораториях из-за ограниченного производства тест-систем.

Одним из более популярных новых способов указания кампилобактера считаются способы, базирующиеся на разработках амплификации и, в частности, метод ПЦР. По причине высокой частоты кровообращения в популяции здоровых особей видов *Campylobacter*, исследования применяются для диагностики кишечных форм, позволяя обнаруживать только лишь термофильную группу данных микробов. В данном случае предпочтение следует отдавать тестовым системам, которые обеспечивают более высокую степень защиты от загрязнения во время исследований.

Бактериологический метод выделения *Campylobacter* spp. влечет за собой трудности в выращивании урожая. Трудность заключается в том, что экокампилобактерии по своей природе являются микроаэрофилами и капнофилами, которые требуют низкого содержания кислорода и повышенного содержания углекислого газа для выращивания. Энергия высвобождается из аминокислот и трикарбоновых кислот, но не из углеводов, которые они не

способны окислять или ферментировать. Кампилобактеры, будучи термофилами, способны расти при 37 - 44 ° С.

На жидких питательных средах кампилобактер через 48 - 72 часа термостатирования образует равномерное помутнение питательной среды с трудом ресуспендируемым, выраженным осадком, на полужидких пробирочных питательных средах в те же сроки образует зону роста в виде диска, расположенного на глубине 1 - 2 мм от поверхности питательной среды.

На плотных питательных средах с кровью *Campylobacter* образует два типа колоний, первый из которых имеет плоскую форму, близкую к круглой, может иметь неправильную форму, диаметром от 2 до 8 мм, колонии этого типа бесцветные или светло-серые, прозрачные, напоминающие по внешнему виду капли воды, не способные к гемолизу. Колонии второго типа имеют правильную круглую форму, диаметр 2 мм, ровные края, блестящую гладкую поверхность и значительно поднимаются над поверхностью питательной среды, прозрачные, однородные. На плотных питательных средах с добавлением бактериологического угля кампилобактер образует плоские округлые колонии правильной формы с ровными краями, белые, блестящие, полупрозрачные, однородные (напоминающие каплю молока), склонные к врастанию в толщу питательной среды.

Культуры *Campylobacter*, выращенные на твердых питательных средах с добавлением крови в течение 48-72 часов, способны приобретать оттенок или образовывать пигмент описанного выше типа.

Campylobacter имеет сложные термолабильные и термостабильные антигенные комплексы.

После посева все чашки Петри складывают в эксикатор. Оптимальный состав газообразной среды для культивирования *Campylobacter* составляет: 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂.

В конце времени эксикатор с чашками Петри извлекается из термостата, и культуры осматриваются для отбора колоний, похожих на *Campylobacter* по культурным признакам.

После отбора колонии пересевают на среду в чашки Петри и помещают в эксикатор. Для создания микроаэрофильных условий использованы вышеуказанные методы.

Ошибки могут возникать в последовательности бактериологического метода из-за человеческого фактора или непредвиденных обстоятельств, и большое количество ожидаемого времени для роста культуры составляет около 72 часов. Не во всех лабораториях есть необходимые условия для проведения этого метода, поскольку требуется специальное оборудование. В случае неудачных обстоятельств этот метод необходимо будет переделать, потеряв время и деньги, повторно выбрав подходящий материал для посева, тем самым снова ранив пациента.

При эндоскопии толстого кишечника в начале тяжёлой стадии болезни видна картина эрозивно-геморрагического колита с обилием светлой или розоватой слизи в просвете кишки, плотно зафиксированной на эпителии слизистой оболочки.

При гистологическом исследовании, обнаруживаются микроэрозии в поверхностном эпителии и глубоком поражении собственной пластинки с превалированием экссудативного и пролиферативного компонентов и максимальной (по сравнению с другими колитами) тканевой эозинофилией. Последняя свидетельствует о выраженном аллергическом компоненте в патогенезе поражений кишки при кампилобактериозе.

Внекишечные поражения при кампилобактериозе являются следствием прогрессирования попадания в кровь бактерий и септический процесс с развитием вторичных гнойных очагов в различных органах и тканях. Обычно это происходит у людей в группе риска на фоне факторов, ослабляющих иммунитет организма, — таких как диабет, туберкулез, алкоголизм, цирроз печени, системные заболевания, злокачественные новообразования, ВИЧ-инфекция и других.

Проблема применения ПЦР для диагностики, распространенных ОКИ в ее дороговизне. Ученые, например, считают, что применение мультиплексной

ПЦР для обследования всех пациентов с диареей может быть экономически оправданным. Если в день их обращения в ЛПУ провести ПЦР анализ на 24 возбудителя кишечных инфекций (вирусы, бактерии, простейшие и гельминты), то большая часть пациентов будет исключена из дальнейшего длительного бактериологического обследования. Инфекционная этиология этих заболеваний будет подтверждена в течение 24 ч. Но можно рассчитывать только на ограниченное использование ПЦР для решения сложных и срочных задач. Целесообразно при этом обследовать пациента сразу на весь доступный спектр соответствующих инфекций.

Целесообразно использовать ПЦР для обследования поступающих в стационар пациентов на сложные и длительно культивируемые возбудители кампилобактериозов. В связи с этим желательно иметь набор мультипрайм-ПЦР, включающий тесты на *E. coli* и *Campylobacter spp.* Продуктивной могла бы быть совместная работа инфекционных стационаров и научноисследовательских учреждений по использованию ПЦР-диагностики ОКИ для изучения особенностей этиологии, эпидемиологии и клиники микст-ОКИ.

При исследовании пищевых продуктов чаще всего применяются методы, основанные на ПЦР в реальном времени, которые обладают наибольшей чувствительностью и позволяют выявлять ДНК жизнеспособных *Campylobacter spp.* Проведение ПЦР-RT требует подбор способов пробоподготовки, включая обогащение образцов в питательных бульонах, иммуномагнитную сепарацию и другие. В зависимости от выбранного целевого гена или нуклеотидной последовательности осуществляется возможность проводить межвидовую дифференциацию термотолерантных представителей рода *Campylobacter* с достаточной степенью достоверности.

Специфичным для идентификации *C. jejuni* считают последовательность *seuE*, амплификация которой позволяет обнаружить специфические фрагменты ДНК у близкородственных микроорганизмов *C. jejuni* и *C. coli*.

Кампилобактерии являются одними из наиболее сложных для культивирования, которое требуется в ходе анализа, микроорганизмов. Объясняется это микроаэрофильностью и возможностью подавления их роста сопутствующей флорой. Род кампилобактерий объединяет как возбудителей ВЗК, так и сапрофитные и условно-патогенные виды, нельзя забывать о них при выявлении этих микроорганизмов в клиническом материале.

Применение наборов на основе ПЦР для определения термофильной группы кампилобактерий позволяет не только избежать трудоемкой и высокочатратной бактериологической работы, но и ограничить детекцию тех видов кампилобактерий, которые имеют этиологическую связь с острой кишечной инфекцией. Данный анализ позволяет с точностью определить возбудителя кишечного заболевания, а быстрая диагностика ОКИ помогает избежать лишних процедур и вмешательств в организм, а также своевременно начать лечение и ограничить распространения инфекции.

1.7 Диагностика НЯКа у пациентов

Не существует конкретных исследовательских критериев для ЯК, и диагноз ставится на основании сочетания ситуации заболевания, медицинской картины и обычных методик осмотра и гистологических перемен. Для этого доктор обязан составить врачебную карту основываясь на:

- Выборочном опросе больных, информации о поездках в южные страны, непереносимости каких-то продуктов питания, принимаемых медицинских препаратов, курении и наличии воспалительных и злокачественных болезней кишечного тракта у членов семьи, дабы ликвидировать наследные болезни.
- Оценивание частоты сердечных уменьшений, температуру тела, артериальное давление, индекс массы тела, присутствие симптомов токсического расширения, положение полости рта, кожи, суставов.
- Обследование перианальной области, цифровое изучение прямой кишки, эндоскопическое изучение нижней части пищеварительного тракта.
- Обзорная рентгенография брюшной полости.
- Тотальная колоноскопия с илеоскопией.

- Биопсия слизистой оболочки толстой кишки берется во время первоначального диагноза, а также с:

- сомнения в правильности ранее поставленного диагноза,

- долгая история ЯК (более 7–10 лет) - поэтапная биопсия (из каждого отдела ободочной кишки) для исключения эпителиальной дизплазии. Рекомендуемым стандартом биопсии является биопсия слизистой оболочки прямой кишки и 4 других областей толстой кишки, а также из подвздошной кишки.

- Ультразвуковое исследование брюшной полости, забрюшинного пространства, малого таза.

- Анализ кала проводится для исключения:

- острой инфекции в начальной диагностике язвенного колита;

- паразитарного колита;

Обследование токсинов производится после курса антибиотикотерапии или в стационаре, а также при тяжелом обострении заболевания, устойчивого к терапии.

Для выявления инфекции в 95% случаев требуется как минимум четыре образца стула.

-исследование уровня фермента кальпротектина кала в первичной дифференциальной диагностике язвенного колита с функциональными заболеваниями кишечника, а также для неинвазивной оценки активности воспалительного процесса в кишечнике в процессе лечения.

- Анализ крови

- Общий анализ мочи.

- При необходимости выполнить:

- магнитно-резонансная томография,

- компьютерная томография,

- трансабдоминальное ультразвуковое сканирование малого и толстого кишечника

- трансректальное ультразвуковое исследование прямой кишки и анального канала,
- рентгеноконтрастное исследование тонкой кишки с суспензией бария,
- фиброгастродуоденоскопия,
- капсульная эндоскопия,
- одна или две энтероскопии.

Еще одним диагностическим критерием достоверного диагноза является Леннард-Джонс, включающий выявление шести ключевых признаков заболевания:

1. Повреждение полости рта, анального канала: хроническое поражение слизистой оболочки губ или щек, повреждение тонкой кишки, хроническое перианальное поражение,
2. Прерывистый характер дефекации,
3. Трещины, абсцессы, свищи,
4. Фиброз,
5. Лимфоидные скопления,
6. Нормальное содержание муцина в зоне активного воспаления слизистой оболочки толстой кишки,
7. Наличие саркоидной гранулемы.

Диагноз считается достоверным, если имеются какие-либо 3 признака или если гранулемы обнаружены в сочетании с любым другим симптомом.

Одним из передовых маркеров для диагностики ВЗК считается кальпротектин. При обострении его степень подымается свыше 150.

По причине нахождения кальпротектина диагноз язвенного колита имеет возможность быть поставлен неверно. Иные патологии копируют эту болезнь, в частности, острые пищеварительные инфекции, к примеру дизентерия, протозойные инвазии, как амебиаз, заболевание Крона, глистные инвазии и иные.

Для исключения всего вышеперечисленного нужно получить отрицательные бактериальные посевы кала и отсутствия антител к

возбудителям в крови. Ряд пищеварительных возбудителей ориентируются или же исключаются путём определения возбудителя способом ПЦР. Данным же способом определяют присутствие гельминтов в кале, собственно, что не ликвидирует диагноз язвенного колита.

Затрудненным является проведение отличительной диагностики между ЯК и БК. Язвенный колит поражает только толстую кишку и в редких случаях при полном поражении толстой кишки наблюдается илеит, когда при илеоколоноскопии выявляется неспецифическое воспаление слизистой подвздошной кишки. Для язвенного колита характерно непрерывное поражение слизистой толстой кишки, тогда как при БК это чаще всего частичное поражение.

При диагностике НЯК чаще всего допускаются ошибки, в связи схожести некоторых кишечных заболеваний, врач должен с вниманием и профессионализмом к выявлению очага заражения и дальнейшего качественного лечения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Получение и парафинизация материала

При подтверждении НЯК пациенту проводят биопсию пораженного участка ткани и проводят гистологическое исследование. Биопсия проводится для выявления природы патологических изменений. От этого зависит тактика дальнейшего лечения, так как заболевания различной природы (злокачественного или доброкачественного характера, специфические воспаления) на начальных этапах своего развития могут визуально выглядеть одинаково, или быть очень похожими друг на друга.

Наиболее часто используемый вид взятия тканей – это щипковая биопсия, производимая с помощью маленьких специальных биопсийных щипчиков. Биопсия бывает прицельная, и поисковая (для диагностики патологических изменений на самой ранней стадии, когда они еще не видны во время колоноскопии).

Забор материала для исследования получают путем аутопсии или биопсии. Планировалось в ходе эксперимента проводить забор ткани с помощью посмертного вскрытия и исследования тела, в том числе и внутренних органов. Наиболее приемлемым для микробиологического исследования принято считать отбор материала в течение первых пятнадцати часов после смерти.

Материал лучше забирать в начале вскрытия перед другими манипуляциями. Отобранные образцы должны доставляться в лабораторию в кратчайшие сроки с соблюдением обычных мер предосторожности при транспортировке.

Для лучшей сохранности, перед отправкой в лабораторию, образцы парафинизируют.

Существуют различные схемы парафинизации полученного материала:

Таблица 1. Схемы парафинизации тканей

	Схема Меркулова	Схема Волковой— Елецкого
<i>Фиксация:</i>	формалин 10 % 24 ч спирт-формол 24 ч жидкость Карнуа 2 – 4 ч спирт 96-100% 2 – 24 ч промывание в проточной воде 12 - 24 ч	
<i>Обезвоживание:</i>	спирт 96 % I 24 ч спирт 96 % II 2 ч спирт 100 % I 24 ч спирт 100 % II 2 ч	спирт 50% 2- 4 ч спирт 60 % 2 - 4ч спирт 70% 12 - 24ч спирт 96 % I 12 ч спирт 96 % II 12 ч спирт 100 % I 1-12 ч спирт 100 % II 12 ч
<i>Заливка в парафин:</i>	Спирт + хлороформ (1:1) 6-12ч или спирт + ксилол (1:1) 1-3ч или хлороформ 6-12ч или ксилол 1-6ч хлороформ + парафин (1:1 — «каша») 37 °С 2-3ч или ксилол + парафин (1:1 — «каша») 37 °С 1-2ч парафин I 56 °С 2ч парафин II 56 °С 1ч	спирт 100 % + хлороформ (1:1) 2-3ч хлороформ I 1,5ч хлороформ II 0,5ч хлороформ III 0,5ч хлороформ + парафин (1:1) 37°С 3-6ч хлороформ + парафин (1:1) 56°С 0,5-1ч парафин I 56°С 2ч парафин II 56°С 2ч парафин III 56°С 1ч

Другие способы заливки:

Таблица 2. Методы заливки

Заливка по Ромейсу ручным способом	Заливка по Ромейсу ручным способом
1 вариант	2 вариант
Фиксация 10% формалин 12ч	10% формалин 12ч
Промывание в проточной воде 2ч	Промывание в проточной воде 2ч
50% спирт 2ч	50% изопропиловый спирт 2ч
75% спирт 3ч	75% 3ч
96% 4ч	90% 6ч

Заливка по Ромейсу ручным способом 1 вариант	Заливка по Ромейсу ручным способом 2 вариант
100% I 4ч	100% Изопропиловый спирт I 4ч
100% II 4ч	100% II 4ч
Метилбензоат I 2ч	Изопропиловый спирт+парафин (1:1) 60*С 12ч
Метилбензоат II 2ч	
Бензол 2ч	
Бензол + парафин (1:1) 1ч	
Парафин 60*С 8ч	Парафин 60*С 8ч
Всего 47ч	Всего 54ч

Самым быстрым и простым, не требующим применения специального оборудования методом заливки материала является способ, который разработан И.И. Золотых в отделении Института хирургии им. А. В. Вишневского.

Таблица 3. Заливка материала по И. И. Золотых

96 % спирт	15 мин
100 % Спирт	15 мин
Хлороформ	15 мин
Хлороформ-парафин при 56°С	15 мин
Парафин при 56 °С	энергично встряхивая 1 мин
Парафин при 56°С	45 мин
Продолжительность	2 ч 30 мин

Парафинизация вырезанных образцов из толстой кишки делится на пять этапов:

1. Взятие материала.
2. Фиксирование в формалине
3. Промывка в воде

После фиксации материал промывают в течение нескольких часов в проточной воде, чтобы избавиться его от избытка фиксатора и различных осадков фиксирующих жидкостей.

4. Обезвоживание и уплотнение

Обезвоживание ткани производится постепенно путем проведения ее через спирты по возрастанию крепости: 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 96°, 100°. В каждом спирте кусочки находятся от нескольких часов до 1 суток в зависимости от величины кусочка.

5. Заливка

Кусочки предварительно пропитаны теми жидкостями, которые служат растворителями для парафина. Дальнейшее наполнение проводят в термостате при температуре 54° -56° в три порции парафина.

Последнее заполнение осуществляется в парафин с добавлением воска, который разливают в специальные бумажные коробки, а затем эти коробки или чашки, после появления пленки на поверхности парафина, погружают в воду. Происходит полное отверждение парафина. Куски с парафином, окружающим их, вынимают из коробок и с помощью расплавленного парафина, наклеенного на деревянные кубики, получают парафиновые блоки.

2.2 Выделение ДНК из материала и депарафинизация

Существуют различные методы депарафинизации полученного материала:

1. Разработанный ФГУ РНЦПХТ(RU 2351632)

Из парафиновых блоков делают срезы толщиной 20 мкм, после к срезу добавляют 100 мкл 0,5% водного раствора Твин20, затем смесь нагревают при +90С в течении 15 минут. Добавляют 50 мкл протеиназы К при +55С и ежечасно взбалтывают, после этого добавляют реагенты: 100 мкл 5% водного раствора Челекс100 и по 5 мкл водного раствора 0,5 М

Трис с РН 8,0 и 1М ЭДТА С РН 8,0 и нагревают до +100С в течении 15 минут и полученный раствор центрифугируют при 10500 об/мин.

Затем после центрифугирования охлаждают при t -1С в течении 5 минут. Удаляют застывший слой парафина стерильным наконечником, остатки нагревают с хлороформом при t +45С, затем центрифугируют при 10500 об/мин. в течении 15 минут, 200 мкл супернатанта переносят в стерильную пробирку и добавляют к нему 5мкл 5М водного раствора NaCl, плюс 500 мкл этилового спирта. После этого центрифугируют при 10500 об/мин. в течении 30 минут при t +4С и верхний слой удаляют, а к осадку добавляют 100 мкл 80% этилового спирта. После вновь помещают в центрифугу при 10000 об/мин. t+4С. Верхний слой удаляют, а нижний слой высушивают при t +65С в теч.10 мин. Растворяют его в 30мкл в бидистиллированной воде.

2. Метод выделения ДНК из ткани, фиксированной в формалине и заключенной в парафин:

Состоит из основных трех этапов:

1) Лизис ТПФ ткань, фиксированная в формалине и заключенная в парафин (ТФП) в растворе щелочи в присутствии детергента в течение 30 мин при температуре 95°С;

2) Депарафинизация методом вымораживания;

3) Осаждение ДНК этанолом.

3. Депарафинизация с помощью коммерческого набора Евроген ExtractDNA FFPE

Депарафинизация с помощью термического воздействия и разделения фаз, лизис ткани, протеиназная обработка и экстракция ДНК в водный раствор.

Характеристики:

-Депарафинизация нетоксичная (без применения органических растворителей)

-Рекомендации к биологическому материалу для срезов FFPE: толщина срезов 5-6 мкм, суммарная площадь фрагментов фиксированной ткани от 2 см², суммарная площадь срезов, используемых для выделения ДНК, до 8 см²

–Пригодна для проведения ПЦР и ее производных, ферментативных реакций. Срок годности выделенной ДНК до 1 года в морозильной камере (от -25 до -15 °С)

Комплектация набора:

- 1) Раствор ДПП (депротеинизирующий и депарафинизирующий раствор) 7.5 мл, 5 пробирок по 1.5 мл
- 2) Лизирующий раствор М 12 мл 1 флакон
- 3) Связывающий раствор М 25 мл 1 флакон
- 4) Промывочный раствор (концентрат) 22 мл 1 флакон
- 5) Элюирующий раствор (5 mM Tris HCl pH 7.5) 6 мл 4 пробирки по 1.5 мл
- 6) Спин-колонки 50 шт. 1 пакет
- 7) Собираемые пробирки 200 шт. 1 пакет

Дополнительное оборудование:

- твердотельный термостат;
- бытовой холодильник с холодильной и морозильной камерами;
- настольная центрифуга для пробирок со скоростью вращения не менее 8 000 g;
- миницентрифуга
- вортекс;
- автоматические дозаторы.

Необходимые расходные материалы:

- стерильные одноразовые хирургические лезвия;
- микроцентрифужные пробирки на 1.5 мл;
- наконечники для дозатора с фильтрами;
- одноразовые неопудренные медицинские перчатки;
- этанол 96%.

Набор предназначен до 50 выделений ДНК.

Перед началом работы необходимо подготовить образцы ткани в FFPE-блоках при соблюдении всех правил безопасности.

1. Работать, соблюдая все правила безопасности, внутри вытяжных шкафов, в перчатках, с использованием одноразовых инструментов и расходных материалов.

2. Избегать загрязнение фрагментов биологического материала друг с другом и с любым другим биологическим материалом.

3. Срок хранения FFPE-блоков не более 3 лет при температуре +15...+25 °С.

4. Площадь срезанного фрагмента FFPE-блоков должна составлять не менее 1 см², толщина — от 5 до 6 мкм, общая площадь среза примерно 2.5 см². Для получения срезов необходимо использовать микротом или хирургическое лезвие.

Ход работы:

1. Подготовка компонентов набора перед первым применением вскройте флакон с концентрированным «Промывочным раствором», добавляли 85 мл этилового спирта (96%).

2. Поместить срезы с FFPE-блоков в микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.

3. Внести 100 мкл «Раствора ДПП» в эту же пробирку.

4. Перемешать содержимое на вортексе в течение 3 с.

5. Термостат при +56 °С на 60 мин.

6. Перемешать содержимое на вортексе в течение 3 с.

7. Термостат при +90 °С на 60 мин.

8. Внести 100 мкл «Лизирующего раствора М» в эту же пробирку.

9. Перемешать содержимое на вортексе в течение 3 с.

10. Центрифугировать пробирку для сбрасывания капель со стенок в течение 5 с.

11. Убрать пробирку в термостате при +98 °С на 2 мин.

12. Центрифугировать пробирку на скорости 10 000 g при комнатной температуре в течение 2 мин.

13. Убрать пробирку в холодильную камеру с температурным оптимумом от +4 до +15 °С на 5 мин. После охлаждения в пробирке будет виден осадок, над ним — полупрозрачная жидкость, над ней — плотное кольцо из застывшего парафина.

14. Наконечником для дозатора сместить в сторону кольцо из парафина. Отобрать 180 мкл жидкости, стараясь не захватывать осадок и парафин

15. Поместить жидкость в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.

16. Инкубировать пробирки в термостате при +56 °С в течение 30 мин. Готовую суспензию с ДНК очищают с помощью магнитных частиц.

2.3 Выделение ДНК с использованием магнитных частиц

В наше время для удобства выделение ДНК из ткани, заключенной в формалин, производят специальные наборы, упрощающие работу и не требующие специального оборудования.

Использовали:

1) Выделение ДНК/РНК из парафинизированных образцов, фиксированных в формалине (FFPE) на магнитных частицах SileksMagNA

Набор содержит количество реагентов, достаточное для проведения 100 процедур выделения либо ДНК, либо РНК.

Компоненты набора:

1. Протеиназа 1 мл
2. Буфер для протеиназы, 1-кратный 10 мл
3. Буфер START 12 мл
4. Буфер Lysis&Binding 24 мл
5. Магнитные частицы SileksMagNA 1 мл
6. Буфер Wash 1 30 мл
7. Буфер Wash 2 30 мл

8. Буфер Wash 3 30 мл
9. Буфер Final Wash 30 мл
10. Буфер Elution 10 мл
11. RNA Protector 0.5 мл

Перед выделением ДНК, образец депарафинизируют по всем правилам осторожности и приступают к выделению НК.

Ход работы:

1. Вносим в пробирку с заранее выделенной ДНК в водном растворе 100 мкл Буфера для протеиназы и 10 мкл протеиназы. Встряхиваем пробирку на вортексе. Помещаем пробирку в термостат на +60 °С. Инкубируем пробирку в течение минимум 1 часа.

2. Переносим пробирку в термостат на +90 °С. Инкубируем пробирку в течение 2 часов.

3. Охлаждаем пробирки на льду в течение 2 минут.

4. Центрифугируем пробирку при 12,000-18,000×g в течение 10 минут. 5. Не затрагивая осадка, отберите супернатант, содержащий ДНК, в новую пробирку.

6. Добавляем 120 мкл буфера START и тщательно перемешиваем раствор.

7. Инкубировать при комнатной температуре 5 минут. Более длительная инкубация (до 15 минут) позволяет повысить выход ДНК.

8. В отдельной чистой пробирке смешиваем следующие компоненты: 240 мкл хорошо перемешанного буфера Lysis&Binding и 5 мкл хорошо перемешанных магнитных частиц SileksMagNA. Тщательно перемешиваем эту смесь.

9. Добавляем приготовленную суспензию магнитных частиц в пробирку с лизированным образцом. Тщательно перемешиваем. Инкубируем 5 минут при комнатной температуре. Дважды-трижды перемешиваем во время инкубации.

10. Помещаем пробирку в магнитный штатив для сбора частиц (может потребоваться до 1 минуты). Удаляем супернатант. Нужно быть осторожным, чтобы не захватить магнитные частицы.

11. Помещаем пробирку в немагнитный штатив. Добавляем 300 мкл хорошо перемешанного буфера Wash 1 и тщательно перемешиваем до получения гомогенной суспензии.

12. Помещаем пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Удаляем супернатант.

13. Помещаем пробирку в немагнитный штатив. Добавляем 300 мкл хорошо перемешанного буфера Wash 2 и тщательно перемешиваем до получения гомогенной суспензии.

14. Помещаем пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Удаляем супернатант.

15. Помещаем пробирку в немагнитный штатив. Добавляем 300 мкл буфера Wash 3 и тщательно перемешиваем до получения гомогенной суспензии.

15. Помещаем пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Удаляем супернатант.

16. Помещаем пробирку в немагнитный штатив. Добавляем 300 мкл буфера FinalWash и тщательно перемешиваем до получения гомогенной суспензии. На этой стадии, когда частицы находятся в буфере Final Wash, ДНК, связанная с частицами, может храниться длительное время. Температура хранения может широко варьировать: от комнатной (+20 °C) до +4 °C, -20 °C и -70 °C. Чем ниже температура, тем выше сохранность. По окончании хранения протокол должен быть продолжен непосредственно со следующего шага.

17. Помещаем пробирку в магнитный штатив для сбора частиц. Удаляем супернатант.

18. Инкубируем пробирку в термостате при 60 °C 5 минут, чтобы высушить осадок частиц.

19. Добавляем 30 мкл буфера Elution. Тщательно ресуспендируем частицы до получения гомогенной суспензии.

20. Инкубируем в термостате при 60 °C 5 минут.

21. Помещаем пробирку в магнитный штатив для сбора частиц и переносим ДНК-содержащий супернатант в чистую пробирку.

2.4 Проведение ПЦР в режиме реального времени

Особенностью ПЦР в реальном времени является возможность детекции накопления продуктов амплификации. Этот метод направлен на исследование накопления продуктов амплификации с помощью специального прибора без постановки электрофореза. Из-за того, что кинетика увеличения продуктов ПЦР связана с начальным количеством матрицы, что дает возможность точно оценить её количество.

Специфичными характеристиками данного метода, в отличие от классической ПЦР, является возможность количественного определения ДНК/РНК инфекционных агентов в исследуемом материале, отсутствие стадии электрофореза, наиболее мягкие требования к организации ПЦР-лаборатории, автоматическая регистрация и истолкование полученных результатов.

Преимуществом при отсутствии стадии электрофореза является то, что понижается риск загрязнения сторонними веществами продукта ПЦР и таким образом резко уменьшается число ложноположительных результатов. Так как регистрация результатов проводится прямо в процессе ПЦР.

ПЦР планировалось провести с помощью детектирующего амплификатора iCycler iQ5 (Bio-Rad, США). Учет результатов проводился с помощью программного обеспечения Bio-Rad iQ5.

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо:

- 1) Выделенная и очищенная ДНК.
- 2) Подобранные заранее родоспецифичные праймеры (обратные и прямые), которые выполняют ключевую роль в образовании продуктов реакции и обеспечивают чувствительность и специфичность реакции. Для ПЦР используют два праймера, которые ограничивают с двух сторон последовательность.

3) Taq-полимераза – фермент, катализирующий реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время.

4) Смесь нуклеотидных оснований, для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.

5) Буферные растворы для поддержания активности и стабильности ферментов.

ПЦР состоит из трех этапов:

1) денатурации, когда двухцепочечная ДНК под действием влияния высокой температуры переходит в одноцепочечное состояние.;

2) отжига, где происходит присоединение праймеров к ДНК с образованием коротких двухцепочечных участков ДНК, необходимых для инициации синтеза ДНК;

3) элонгации (удлинения цепи).

Смена этапов каждого цикла проводится путем изменения температуры реакционной смеси. Вначале праймеры связываются только с конкретной последовательностью исходной ДНК, но в следующих циклах они соединяются с копиями этой последовательности, которые были синтезированы в предыдущих циклах. По причине этого, количество основного продукта ПЦР теоретически удваивается в каждом цикле.

Компоненты для проведения реакции:

1) Выделенная ДНК (1 мкл/образец),

2) Детекционная смесь (25 мкл/образец), включающая в себя:

-2,5 мкл Taq-буфера,

-2,5 мкл DNTP,

-16,5 мкл деионизованной воды,

-0,5 мкл Taq-полимеразы,

-по 1 мкл праймеров CampF (5'-AGAACACGCGGACСТАТАТА-3') и CampR (5'-CGATGCATCCAGGТААТGTAT-3').

Таблица 4. Режим амплификации

1. Денатурация	95°C, 30 сек	30 циклов
2. Отжиг	60°C, 30 сек	
3. Элогация	72°C, 30 сек	

Ход работы:

1. Подготовить и расставить в штативе пробирки с тотальной ДНК, предварительно выделенной из парафиновых блоках, детекционную смесь.

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

3. В подготовленные пробирки внести выделенную ДНК (1 мкл/образец) и детекционную смесь (25 мкл/образец), используя наконечники с фильтром.

4. Пробирки плотно закрыть, перемешать содержимое встряхиванием (не должно быть пузырей воздуха и капель реакционной смеси на стенках пробирок), затем перенести пробирки в амплификатор и расставить соответствующим образом.

5. На приборе задать соответствующие параметры, такие как: размер, тип, название проб, объемы в одной пробирке и запускали программу.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Получение ткани, фиксированной в формалин, и заключенная в парафин

Для гистологических исследований, биоптаты взятые у больных и зафиксированные в парафине, направляются микробиологический анализ для выявления бактерий, которые могут быть причастны к данной болезни.

Взятие биопсии у пациентов намного безопаснее, чем взятие мазков, так как как в мазки нарушают целостность оболочки кишечника и травмируют язвы, также врач может ошибиться во время взятия мазка, тем самым ещё больше повредить больные участки толстого кишечника.

Перевозка взятых мазков трудоемкий процесс и сложность состоит в подготовке условий для транспортировки в лабораторию. парафиновые блоки с материалом лучше сохраняют микроорганизмы, не требует транспортных питательных сред, для перевозки им нужна температура от + 4 до + 6 градусов. Также ДНК в парафиновых блоках намного стабильна.

Способ культивирования *Campylobacter* трудоемкий процесс, затруднение возникает в визуальном выявление на фоне цвета среды мелких плоских колоний бактерий, также сам способ приготовления специальных сред для которых требуется забор крови, дополнительная стадия-лизирование крови, ограниченный срок хранения крови, а также транспортировка и получение от сторонних организаций.

Предполагалось получить биоптаты из морга Городской клинической больницы № 21 города Уфы, где используют метод заливки материала, разработанный И. И. Золотых.

Таблица 5. Метод заливки материала, разработанный И. И. Золотых

96 % спирт	15 мин
100 % Спирт	15 мин
Хлороформ	15 мин
Хлороформ-парафин при 56°C	15 мин

Парафин при 56 °С	энергично встряхивая 1 мин
Парафин при 56°С	45 мин
Продолжительность	2 ч 30 мин

Все методы парафинизации пригодны к использованию, различия состоит только в длительности времени заливки материала. Фиксация ткани и хранение её в виде парафинового блока — традиционный и рациональный способ работы с гистологическим материалом. Этот подход позволяет сохранить структуру тканей и хранить материал в течение длительного времени.

3.2 Выделение ДНК с помощью магнитных частиц

Самым прогрессивным и современным методом очистки ДНК, существующий на сегодняшний день, является выделение нуклеиновой кислоты с использованием магнитных частиц. Это быстрый способ основан на связывании НК с веществом, покрывающим магнитные частицы.

Метод чрезвычайно прост и основан на двух принципах:

- 1) Способность поверхности частиц обратимо связывать молекулы ДНК,
- 2) Легко осадить ресуспендированные магнитные частицы из раствора при помощи магнитного поля.

Для выделения этим методом не требуется сложное лабораторное оборудование и экономит время, благодаря отсутствию этапов центрифугирования.

В наше время существует большой выбор наборов для выделения ДНК этим методом, благодаря коммерческим организациям, где в наборе присутствуют все необходимые растворы.

Положительные стороны данного метода это возможность выделять большое количество нуклидов за счёт большого объёма сорбента; в момент выделения минимизированы потери; малый риск перекрёстной контаминации, так как почти все нуклеиновые молекулы связываются сорбентом; масштабность методики; высокое качество продукта на выходе.

Для процесса выделения используются магнитные носители с иммобилизованными аффинными лигандами или изготовленные из биополимера, который увеличивает сродство к нужной НК. Магнитные частицы изготавливаются из различных синтетических полимеров, биополимеров, пористого стекла или на основе неорганических магнитных материалов, таких как оксид железа с измененной поверхностью. Эти частицы приобретают магнитный момент в сильном магнитном поле, но не сохраняют постоянного магнетизма при удалении поля. Если магнитное объединение и прилипание частиц устранены, то в ходе реакции достигается суспензия частиц и равномерное извлечение нуклеиновых кислот.

Учитывая все преимущества данного метода, было решено провести депарафинизацию с помощью коммерческих наборов с уже готовыми реакционными смесями.

Проверку на качество выделенной ДНК предполагалось провести на спектрофотометре Thermo Scientific NanoDrop 2000, предназначенным для микрообъемов, производит определение спектра поглощения препарата в диапазоне длин волн 190-840 нм.

Депарафинизация набором Евроген предварительно очистил выделяемую ДНК, но для повышения качества использовали дополнительно набор Sileks.

3.3 Подбор условий для амплификации ДНК

Подбор и проверку родоспецифичных праймеров осуществляли с применением программ Primer Select (DNASTAR) и BioEdit и электронного ресурса PrimerBlast (NCBI). При подборе праймеров учитывались важные параметры: температура отжига прямого и обратного праймера, длина праймеров от 18-25 п.н, а также низкую возможность образования вторичных структур.

Праймеры играют существенную роль в чувствительности и специфичности ПЦР-реакции. Поэтому выбору целевого гена в качестве

мишени и структуре праймеров уделяется огромное внимание при разработке ПЦР.

В зависимости от выбранного целевого гена или нуклеотидной последовательности можно проводить межвидовую дифференциацию термотолерантных представителей *Campylobacter spp.* с достаточной степенью достоверности. Последовательность *seuE* считается наиболее специфичной для идентификации *C. jejuni*, амплификация которой позволяет обнаруживать видоспецифичные фрагменты ДНК у близкородственных микроорганизмов *C. jejuni* и *C. coli*.

Таблица 6. Способ детекции возбудителя по целевому гену

Метод и способ обнаружения продуктов ПЦР	Возбудитель	Ген-мишень
ПЦР-RT, анализ пиков плавления	<i>C. jejuni</i>	<i>cadF</i>
ПЦР-RT, TaqMan зонды	<i>C. jejuni</i>	ORF-C
ПЦР-RT, TaqMan зонды	Термотолерантные <i>Campylobacter</i>	16srRNA
ПЦР-RT, анализ пиков плавления	<i>C. jejuni</i>	<i>cadF</i>
ПЦР- RT в системе Lightcycler, анализ пиков плавления	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> , <i>C. jejuni</i>	16srRNA <i>hipO</i>
ПЦР-RT, анализ пиков плавления	<i>C. jejuni</i>	<i>cadF</i>
ПЦР-RT в системе Lightcycler	<i>Campylobacter spp.</i>	16srRNA
ПЦР- RT, TaqMan зонды	<i>Campylobacter spp.</i>	16srRNA

Подбирали родоспецифичные праймеры к 16srRNA и были использованы CampF/CampR.

3.4 Проведение ПЦР RealTime

Рассчитывалось провести полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени и получить положительные результаты на эксперимент.

В ходе мониторинга научных публикаций и литературы, выходящей в период от 2017 по 2019 год, детекция бактерий рода *Campylobacter* методом амплификации дали положительные результаты. Высокая чувствительность и специфичность данной тест системы позволяют использовать разработанный метод в быстрой диагностике кампилобактериоза, а также для обнаружения участия бактерий данного рода в болезни НЯК.

Решение о присутствии *Campylobacter* spp. в исследованном образце выдают при получении положительного результата ПЦР (выявлении ДНК) и подтверждения их жизнеспособности.

Таблица 7. Интерпретация результатов ПЦР-исследования

Результат по уровню флуоресценции		Результат
Канал FAM	Канал JOE	
<u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	В пробе выявлена ДНК <i>Campylobacter</i> spp.
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена ДНК <i>Campylobacter</i> spp.
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Результат невалидный - проба требует повторного тестирования с этапа выделения ДНК
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения отрицательного результата и <u>ниже</u> порогового значения положительного результата	Результат сомнительный - проба требует повторного ПЦР-исследования

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При использовании стандартной диагностики бактерий рода *Campylobacter* значительно увеличивается время ожидания результатов и несет в себе некоторые сложности, например, как ошибки на фоне человеческого фактора и условия культивирования данных бактерий.

В случае НЯК нельзя растягивать время и нужно сразу переходить к лечению, чтобы избежать перехода болезни в хроническую форму, для этого необходимо улучшить методы лабораторной диагностики, чтобы повысить эффективность и быстроту детекции бактерий.

Внедрение в лабораторную диагностику при НЯК ПЦР в режиме реального времени может значительно упростить и повысить результативность детекции *Campylobacter spp.*

ПЦР реального времени несет множество плюсов, таких как отсутствие стадии электрофореза, автоматизация метода, регистрация и интерпретация результатов, полученных в процессе, что несет уменьшение ложноположительных результатов.

Для проведения ПЦР анализа были подобраны родоспецифичные праймеры и гены-мишени, также режим амплификации.

ВЫВОДЫ

1. Сбор образцов проводился врачом с использованием щипковой биопсии. Парафиновые блоки были залиты методом, разработанным И. И. Золотых в патологоанатомическом отделении Института хирургии им. А. В. Вишневского.

2. Были использованы 2 коммерческих набора. Евроген для депарафинизации и экстракции ДНК в водный раствор, потому что качество (и целостность) нуклеиновых кислот преимущественно зависит не от методики выделения, а от процедуры фиксации выделенной НК. Повреждения, полученные молекулами ДНК в ходе депарафинизации, являются необратимыми, новейшие методы менее агрессивны.

Набор Sileks с использованием магнитных частиц для очистки НК и повышение чистоты и качества готового продукта.

3. При диагностике НЯК был задействован метод ПЦР RealTime. Культивирование с дальнейшей диагностикой вызывали значительные затруднения, потому что для выращивания *Campylobacter spp.* необходимы специальные условия и питательные среды.

4. ПЦР RealTime наиболее эффективна в детекции бактерий рода *Campylobacter* с родоспецифичными праймерами, которые обеспечивают обнаружение данных бактерий в биоптатах. С учетом «двойной» очистки ДНК-материал не нес в себе остатки парафина или сопутствующих растворов, применяемых для депарафинизации, что отменяло возможность получения либо ложноположительных результатов, либо ложноотрицательных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдрахманова С.Т., Сатыбаева Р.Т., Рысбеков К.Д. Состояние микробиоты и местного иммунного статуса кишечника у детей с воспалительными заболеваниями кишечника. 2018; с. 53-58
2. Абдулхаков С.Р., Абдулхаков Р.А. Неспецифический язвенный колит: Современные подходы к диагностике и лечению// Вестн. соврем. клинич. медицины, 2009. Т2, вып. 1. С. 32-41
3. Антонова О. С., Корнева Н. А., Белов Юрий Васильевич, Курочкин В. Е. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор) // НП. 2010. №1. С. 6
4. Батаева Д.С., Минаев М.Ю., Юшина Ю.К., Соколова О.В., Зайко Е.В. Концептуальные подходы к экспресс выявлению *Campylobacter spp.* В мясе убойных животных // Theory and practice of meat processing № 4, 2017.
5. Данилова Н.А., Абдулхаков С.Р., Григорьева Т.В., Маркелова М.И., Павленко А.В., Тяхт А.В., Дубинкина В.Б., Кострюкова Е.С., Ларин А.К., Скородумова Л.О., Манолов А.И., Одинцова А.Х., Абдулхаков Р.А. ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ // ЭиКГ. 2017, №6.
6. Дорофеев А.Э. Клинико-патогенетическая характеристика неспецифического язвенного колита с внекишечными поражениями и оптимизация его терапии: автореф. дис. д-ра. мед. наук.: 14.01.36— Днепропетровск, 2004; с. 40.
7. Дорофеев А.Е., Швец О.В., Эпидемиология и факторы риска при воспалительных заболеваниях кишечника. 2014; (11):22–9.
8. Ефимочкина Н.Р. Оценка роли бактерий рода *Campylobacter* в возникновении пищевых токсикоинфекций и современные методы обнаружения возбудителя. Вопросы питания. Том 84, № 6, 2015 с. 7,8,9
9. Камалова А.Ф., Назмутдинов А.Т., Стяжкина С.Н. Эпидемиология болезни Крона и неспецифического язвенного колита в проктологическом

отделении БУЗ «1РКБ МЗ» за 2014 год // Наука, техника и образование. 2015. №3

10. Кораблева Н.Ю., Попова Л.И., Давыдова И.В., Тимченко О.Л. Инфекционные агенты в развитии воспалительных заболеваний кишечника: научный обзор // ЗНиСО. 2016. №2 (275). С. 44,45

11. Курако У.М. Характеристика и распространение бактерий рода *Samruylobacter* в продуктах убоя птицы: диссертация кандидата биологических наук: 03.00.07 / Саратов, 2008.- 109 с, с. 13,14

12. Кучумова С.Ю., Полуэктова Е.А., Шептулин А.А., Ивашкин В.Т. Физиологическое значение кишечной микрофлоры. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2011; 21(5): 17- 27.

13. Лягина И.А., Корнева Т.К., Головенко О.В., Веселов А.В. Характеристика кишечной микрофлоры. Российский журнал гепатологии, гастроэнтерологии и колопроктологии. – 2008. №2.– С. 49-55.

14. Мальков П.Г., Франк Г.А., Москвина Л.В., Данилова Н.В., Завалишина Л.Э. Основы обеспечения качества в гистологической лабораторной технике: Руководство / Под ред. Малькова П.Г., Франка Г.А. / – М., 2011.- 13 с., 23 с.

15. Молочкова О.В., Ковалев О.Б., Россина А.Л., Шамшева О.В., Корсунский А.А., Кащенко О.А., Галеева Е.В., Крылатова Н.И., Чуелов С.Б., Пылаева Е.Ю., Караулова В.Е. Клинико-этиологическая характеристика Оки у госпитализированных детей города Москвы в 2015-2017 гг // Детские инфекции. 2018. №3.

16. Маев И. В., Черемушкин С. В. Синдром раздраженного кишечника: Учебное пособие. — М., ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2004.

17. Методические рекомендации. Микробиологическая диагностика кампилобактериоза. Номер документа:01/15702-8-34, 26 декабря 2008

18. Морозкин Е.С., Лактионов П.П., Власов В.В. Способ выделения днк из парафиновых блоков с гистологическим биоматериалом., 2016 г.

19. Полуэктова Е.А., Ляшенко О.С., Королев А.В. Механизмы, обеспечивающие взаимодействие бактериальных клеток с организмом хозяина, и их нарушение у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2014; 5: 42–53
20. Писарева Е. Е., Любченко Л. Н., Коваленко С. П., Шаманин В. А. Оптимизация метода выделения ДНК из ткани, фиксированной в формалине и заключенной в парафин // Вестн. Новосиб. гос. ун-та. Серия: Биология, клиническая медицина. 2015. Т. 13, вып. 2. С. 32–39.
21. Рубинчик С. М. Роль капсулы *Campylobacter jejuni* при адгезии к клеткам-хозяевам // Биомедицина (Баку). 2016.
22. Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению взрослых больных язвенным колитом, Клинические рекомендации 1, 2015 г, 52-53
23. Середкина М.А., Кречикова О.И., Сухорукова М.В. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия №2, т.2, стр. 81, 2000.
24. Совалкин В.И., Бикбавова Г.Р., Емельянова Ю.А. Современный взгляд на патогенез и лабораторную диагностику язвенного колита (обзор литературы). 2017;7(4):252-259.
25. Соколова Екатерина Дмитриевна, Галтаева А.М., Замурий О.Ю., Дидиченко О.В., Соколова Ю.В., Муратова В.А., Лигорова О.Ю., Журавлева И.Н., Макарова М.А., Кафтырева Л.А. Полимеразная цепная реакция в диагностике острых кишечных инфекций в детском инфекционном стационаре: возможности и проблемы // Инфекция и иммунитет. 2016. №3.
26. Стеценко Валентина Валерьевна, Ефимочкина Наталья Рамазановна Механизмы формирования антибиотикорезистентности бактерий рода *Campylobacter* // Антибиотики и химиотерапия. 2018. №9-10.
27. Терлецкий В.П., Новикова О.Б., Тыщенко В.И., Шинкаренко Л.А. in - silico подбор ферментов для генотипирования изолятов бактерий рода *campylobacter*, выделенных у птиц // Известия НВ АУК. 2019. №3 (55).

28. ФГУ РНЦПХТ(RU 2351632)
29. Халиф И.Л., Лоранская И.Д. Воспалительные заболевания кишечника (неспецифический язвенный колит и болезнь Крона) клиника, диагностика и лечение. –2004. – С.85.
30. Шапошников В.И., Сторожук П.Г. О патогенезе неспецифического язвенного колита // Кубанский научный медицинский вестник. 2013. №7.
31. Шрамова Е., Альдова Е., Лготова Г. инструкция по клинической и лабораторной диагностике кампилобактериоза. Прага 21 ноября 1989 г. N 15-6/28
32. Язвенный колит у взрослых. Клинические рекомендации. Российская гастроэнтерологическая ассоциация Ассоциация колопроктологов России. 2016
33. Aaron E. Walfish , MD, Mount Sinai Medical Center; Rafael Antonio Ching Companioni , MD, Digestive Diseases Center, Last full review/revision September 2017 by Aaron E. Walfish
34. Budding A.E., Grasman M.E., Lin F., Bogaards J.A., SoeltanKaersenhout D.J., Vanderbroucke-Grauls C.M. et al. IS-pro: high-throughput molecular fingerprinting of the intestinal microbiota. FASEB J. 2010; 24(11): 4556-64.
35. El-Deiry W., Baumeister M. Faculty of 1000 evaluation for Gut microbiome influences efficacy of PD1-based immunotherapy against epithelial tumors. F1000 - Post-Publication Peer Review of the Biomedical Literature. 2018.
36. Juraev Rivojiddin The role of viral etiology in the development of acute gastroenteritis in children in Uzbekistan // European science review. 2016. №3-4.
37. Kaur N., Chen C.C., Luther J., Kao J.Y. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. Gut Microbes 2011; 2: 211-216.
38. Lisa D. Kalischuk, and Andre G. Buret A role for Campylobacter jejuni-induced enteritis in inflammatory bowel disease? 01 JAN 2010 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 298: G1–G9, 2010. First published October 29, 2009;

39. Navaneethan, U.; Giannella, R. A. Infectious Colitis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2011, 27, 66–71
40. Ng SC. Emerging leadership lecture: Inflammatory bowel disease in Asia: emergence of a “Western” disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2015; 30:440–5.
41. Pozdeeva Maria Anatolyevna, Osmanova Gyulmira Shamilevna, Irkhina Irina Evgenievna Campilobacteriosis in the population of the european-north Arctic zone // *International scientific review.* 2019. №LVIII.
42. Silina E.A., Usacheva E.V., Pahol'chuk T.M., Pahol'chuk O.P., Ginzburg R.M., Rodko A.S., Matveeva T.B. Sovremennye kliniko terapevticheskie aspekty kampilobakterioza u detej [Modern clinical and therapeutic aspects of campylobacteriosis in children]. *Sovremennaja pediatrija – Modern pediatric*, 2011, № 2, P. 65-66.
43. Vikneswari Mahendran, Stephen M. Riordan, Michael C. Grimm, Thi Anh Tuyet Tran, Joelene Major, Nadeem O. Kaakoush, Hazel Mitchell1, Li Zhang, Prevalence of Campylobacter Species in Adult Crohn’s Disease and the Preferential Colonization Sites of Campylobacter Species in the Human Intestine
44. Daniel Siegal MDab Fathima Syed MDab Naveed Hamid MDab Burke A. CunhaMD, Campylobacter jejuni pancolitis mimicking idiopathic ulcerative colitis, *Heart & Lung* Volume 34, Pages 288-290 Issue 4, July–August 2005
45. Vrakas S., Mountzouris K. C., Michalopoulos G. et al. Intestinal Bacteria Composition and Translocation of Bacteria in Inflammatory Bowel Disease // *PLoS One.* 2017. Vol. 12
46. Wood S.H., Oldstone M., Schultz R.B. A reevaluation of blood cultures as an autopsy procedure. *Am J Clin Pathol*, 1965; 43:241-7
47. Zubin Arora, Saurabh Mukewar, Xianrui Wu, and Bo Shen, Risk factors and clinical implication of superimposed Campylobacter jejuni infection in patients with underlying ulcerative colitis. *Gastroenterol Rep (Oxf).* 2016 Nov; 4(4): 287–292
48. Zwolinska-Wsislo M.?, Borozovski T., Budak A. Effect of Candida colonization on human ulcerative colitis and healing of inflammatory changes of the colon in experimental model of colitis ulcerosa – 2009.–Vol. 60, № 1. –P.107-120

49. Заливка гистологического материала [Электронный ресурс] // URL: <https://www.forens-med.ru/book.php?id=515> (дата обращения: 10.05.2020)
50. Техника приготовления гистологических препаратов [Электронный ресурс] // Микроскопическая техника URL: <http://labx.narod.ru/index.html> (дата обращения: 15.05.2020)

Выпускная квалификационная работа выполнена мной самостоятельно. Используемые в работе материалы из опубликованной научной литературы и других источников имеют ссылки на них. Проверка в системе «Антиплагиат» выполнена.

Уровень оригинальности работы составляет _____%.

Работа изложена на _____ страницах машинописного текста, содержит _____ таблиц, _____ рисунков. Библиографический список включает _____ источников, из них _____ отечественных и _____ иностранных авторов.

подпись Фамилия, Имя, Отчество полностью

«___» _____ 201__ г.



СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Исламова Карина Ильдаровна
Подразделение	Медико-профилактический факультет с отделением биологии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ
Тип работы	Выпускная квалификационная работа
Название работы	СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ CAMPYLOBACTER SPP. В ТКАНЯХ ТОЛСТОЙ КИШКИ ПРИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ
Название файла	ВКР Исламова К.И. Б401 2 (1).docx
Процент заимствования	33.56 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	1.44 %
Процент оригинальности	65.00 %
Дата проверки	10:49:09 10 июня 2020г.
Модули поиска	Модуль поиска ИПС "Адилет"; Модуль поиска "БГМУ"; Модуль выделения библиографических записей; Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Модуль поиска переводных заимствований по eLibrary (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu); Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция Патенты; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов
Работу проверил	Кобзева Наталья Рудольфовна ФИО проверяющего
Дата подписи	10.06.20 ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА Подпись проверяющего

Чтобы убедиться
в подлинности справки,
используйте QR-код, который
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.

ОТЗЫВ

на выпускную квалификационную работу обучающейся группы _____ Б 401 А
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)
Исламова Карина Ильдаровна
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: Сравнительная оценка частоты встречаемости *Campylobacter spp.* в тканях толстой кишки при неспецифическом язвенном колите

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и графического материала, соответствие работы заданию Объем текстовой части и иллюстрационно-графического материала работы составил 55 страниц, 7 таблиц. Работа выполненная в традиционном стиле, сохраняя основную концепцию и содержит такие главы, как: введение, литературный обзор, описание объекта исследования и методов исследования, заключение и выводы, список использованной литературы.

2 Актуальность темы выпускной квалификационной работы (ВКР). Методы и способы решения конкретных проблем, представленных в ВКР, основные достоинства и недостатки ВКР. Актуальность в оптимизации способов детекции *Campylobacter spp.* заключается в сложности культивирования данных бактерий и использования устаревших методов обнаружения. Использование новых и методик детекции намного сократят время, потраченное на выведение чистой культуры *Campylobacter spp.*, и помогут качественно и своевременно поставить диагноз «неспецифический язвенный колит».

3 Умение самостоятельно и творчески решать задачи, поставленные в задании на выполнение ВКР, подготовленность к выполнению профессиональных задач. Выполнены в полном объеме поставленные задачи. Проведен основательный анализ литературы, посвященной данной проблеме, имеет практическую направленность, в должной мере раскрыты основные методики способов детекции бактерий *Campylobacter spp.*

4 Использование современных информационных технологий при выполнении и оформлении ВКР. при написании работы использовались следующие программы: Microsoft Word, Microsoft PowerPoint, владение программ хорошее

5 Умение пользоваться справочной, научной, научно-технической и патентной литературой, в том числе зарубежной. Автор освоил методы, необходимые для профессиональной деятельности

6 Соблюдение календарного графика подготовки ВКР. График подготовки ВКР соблюдался.

7 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала ВКР в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствие с требованиями оформления, предъявляемые к оформлению содержания выпускных квалификационных работ (ВКР)

8 Дополнительные сведения о ВКР и работе студента в период ее подготовки (при необходимости). Замечаний нет.(дополнительные сведения представлены на _____ листах приложения)

9 Апробация и реализация результатов, полученных в ВКР: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. Не имеются

10 Возможность использования результатов, полученных в ВКР, в учебном процессе и в производстве, а также возможность опубликования в открытой печати результатов, полученных в ВКР или другое. Данные полученные при выполнении практических и теоретических методов могут быть использованы для дальнейшей реализации в учебном процессе и для публикаций

11 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно") и рекомендация о присвоении квалификации. Заслуживает оценки «отлично» и рекомендуется к присвоению студенту-выпускнику квалификации степени Бакалавр

Руководитель выпускной квалификационной работы
Мавзютов Айрат Радикович, профессор

(Фамилия, имя, отчество, должность)



(Подпись)

« ____ » _____ 20__ года

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401А
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Исламова Карина Ильдаровна
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: Сравнительная оценка частоты встречаемости *Campylobacter spp.* в тканях толстой кишки при неспецифическом язвенном колите

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой. Объем текстовой части работы составил 55 страниц и 7 таблиц. Работа выполненная в традиционном стиле, сохраняя основную концепцию и содержит такие главы, как: введение, литературный обзор, описание объекта исследования и методов исследования, заключение и выводы, список использованной литературы.

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения. Актуальное направление относительно новой методике выделения и очистки ДНК, что является весьма полезным в данном исследовании, так как материал для постановки ПЦР выделяется из парафиновых блоков

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. В работе корректно сформулированы выводы и заключение, также объективно и последовательно были выполнены поставленные в данной исследовательской работе цели и задачи. Обоснованные на литературных источниках собственные исследования и литературный обзор представлены в полном объеме.

4 Технично-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе. Практическая часть выполнена со всеми требованиями техники безопасности, а также был проведен инструктаж по работе с условно-патогенными микроорганизмами.

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств. В работы применены приложения Microsoft Word.

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. Отсутствует

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. Автор работы четко отвечает на поставленные задачи, делает обоснованные выводы и заключение, отвечающее поставленной цели.

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. При написании были выполнены все требования к оформлению ВКР

9 Обоснованность выводов и предложений Автор работы четко отвечает на поставленные задачи, делает обоснованные выводы и заключение, отвечающее поставленной цели.

10 Замечания по усмотрению рецензента

Замечания отсутствуют

(дополнительные замечания представлены на _____ листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др. Результаты полученные при написании ВКР рекомендуются к публикациям и в дальнейшей реализации в учебном плане

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени).

Данная выпускная квалификационная работа освещает актуальные проблемы детекции рода *Campylobacter spp.*, является в смысловом и научном отношении законченной и основательной, соответствует всем требованиям и заслуживает оценки отлично и рекомендуется к присвоению студенту-выпускнику квалификации степени Бакалавр

Рецензент

зав. ЦНИЛ, доцент кафедры ФПМ
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
(Место работы, занимаемая должность)

М.П.*

Mos

Мочалов К.С.
(Инициалы и фамилия)

« ____ » _____ 20 ____ года

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу обучающейся группы _____ Б-401А
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Исламова Карина Ильдаровна
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: Сравнительная оценка частоты встречаемости *Campylobacter spp.* в тканях толстой кишки при неспецифическом язвенном колите

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой. Объем текстовой части работы составил 55 страниц и 7 таблиц. Работа выполненная в традиционном стиле. Содержит такие главы, как: введение, литературный обзор, описание объекта исследования и методов исследования, заключение и выводы, список использованной литературы, выполненные в соответствии со стандартами

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения. Актуальное направление в оптимизации способов детекции *Campylobacter spp.* заключается в сложности культивирования данных бактерий и использования устаревших методов обнаружения. Использование новых и более усовершенствованных методик детекции намного сократят время, потраченное на выведение чистой культуры *Campylobacter spp.*, и помогут качественно и своевременно поставить диагноз «неспецифический язвенный колит».

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. – Замечаний нет
4 Техничко-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе. Практическая часть выполнена со всеми требованиями техники безопасности. Были также освоены все необходимые компетенции для решения задач.

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств. Использован пакет программ приложения Microsoft Word

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. Отсутствует

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. В работе корректно сформулированы выводы и заключение. Поставленные в данной исследовательской работе цели и задачи логично и последовательно выполнены. Работа включает большой литературный обзор. Основная часть работы посвящена анализу методов и литературных данных, что является похвальным.

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствии с требованиями оформления, предъявляемые к оформлению содержания выпускных квалификационных работ (ВКР).

9 Обоснованность выводов и предложений Автор работы конкретно отвечает на поставленные задачи с законченными выводами, делает обоснованное заключение, отвечающее поставленной цели.

10 Замечания по усмотрению рецензента _____
Замечаний нет.
(дополнительные замечания представлены на _____ листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др. _____
Результаты полученные при написании ВКР рекомендуются к в дальнейшей реализации в учебном плане.

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени). Данная выпускная квалификационная работа посвящена проблеме детекции рода *Campylobacter spp.*, является законченной и основательной, соответствует всем требованиям и заслуживает оценки отлично и рекомендуется к присвоению студенту-выпускнику квалификации степени Бакалавр.

Рецензент
Л.М. Масягутова
(Место работы, занимаемая должность)
М.П.*

« _____ » _____ 20 _____ года



Масягутова Л.М.

(Инициалы и фамилия)

Зав. отделом кадров
ФБУН «Уфимский НИИ медицины
труда и экологии человека»