

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

Чуваткина Анна Кирилловна

СОЗДАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО НАБОРА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
В КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

Научный руководитель:
д.б.н., профессор
кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии


(подпись)

Ан.Х. Баймиев

Уфа – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

Перечень условных обозначений (сокращений).....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4-5
ГЛАВА I. Обзор литературы.....	6
1.1. Характеристика <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6-7
1.2. Клиническое значение.....	7-9
1.3. Микробиологическая диагностика.....	9-10
1.3.1 Бактериологический метод исследования.....	10-12
1.3.2 Серологический метод исследования.....	12-14
1.4. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	15-16
1.4.1 ПЦР в реальном времени (РТ-ПЦР).....	16-18
ГЛАВА II. Материалы и методы.....	19
2.1. Материалы исследования.....	19-20
2.2. Культивирование и приготовление питательных сред для энтеробактерий: <i>Klebsiella pneumoniae</i> и <i>Escherichia coli</i>	21-22
2.3. Выделение бактериальной ДНК из бактерии.....	22-23
2.4. Проведение стандартной полимеразной цепной реакции (ПЦР).....	23-24
2.5. Детекция результатов ПЦР.....	24-25
2.6. Молекулярное клонирование.....	25-27
2.7. Выделение плазмидной ДНК.....	27-28
2.8. Метод серийных разведений.....	28
2.9. Подсчет концентрации ДНК.....	28
2.10. Проведение ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР).....	29-30
ГЛАВА III. Результаты и обсуждение.....	31
3.1. Конструирование калибратора для количественной оценки содержания <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31-34
3. 2. Перевод концентрации ДНК в ген-эквиваленты бактериальных клеток...	34-35
ВЫВОДЫ.....	35
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	36-42

Перечень условных обозначений (сокращений)

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

МПБ – мясо-пептонный бульон

МПА – мясо-пептонный агар

РСК – реакция склеивания комплимента

АТ – антитело

АГ – антиген

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

K. pneumoniae - *Klebsiella pneumoniae*

E. coli – *Escherichia coli*

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. *Klebsiella pneumoniae*, входит в число представителей семейства *Enterobacteriaceae*, которые имеют широкое распространение в окружающей среде. Бактерии данного вида встречаются повсеместно в пресных и морских водах, в почве и на растениях, а также размножаются в слизистых оболочках тонкого кишечника, урогенитального тракта и верхних дыхательных путей (Bei Li, 2014). В Российской Федерации, как и во всем мире, *K. pneumoniae* вызывает обширный спектр заболеваний у людей. Микроорганизм вызывает инфекции дыхательных и мочевыводящих путей, поражает центральную нервную систему и желудочно-кишечный тракт, развивает бактериемию, кожный сепсис и первичные абсцесс печени (Hennequin, 2016). Бактерия также может вызывать у женщины после родов гнойно-воспалительные заболевания, у грудничков присутствие возбудителя проявляется в виде пневмонии, кишечной инфекции и токсико-септического состояния, которое не редко заканчивается летальным исходом (Николаева, 2016).

Ключевым источником *K. pneumoniae* является человек. Размножаясь на поверхностях слизистых оболочек, бактерия не всегда вызывает воспалительные процессы, поэтому считается условно-патогенным микроорганизмом. Обычно от 1 до 6% людей считаются носителями *K. pneumoniae*, пребывающих в носоглотке, от 5 до 38% являются носителями бактерии в кишечном тракте. Со слизистой оболочки микроорганизм может распространяться на другие ткани и органы, вызывая опасные для жизни инфекционные заболевания (Walter, 2018).

В связи с этим является весьма актуальной разработка тест системы не только для выявления возбудителя, но с возможностью количественного определения патогена в клинических образцах.

Цель исследования. Разработка способа ускоренной молекулярно-генетической количественной оценки *Klebsiella pneumoniae* в клинических образцах.

Задачи исследования.

1. Выделение ДНК *Klebsiella pneumoniae*, для последующего проведения ПЦР.
2. Амплификация и клонирование гена 16S рРНК в плазмидный вектор рAL-ТА.
3. Создание серии разведений плазмидной ДНК и формирование молекулярно-генетического калибратора для РТ-ПЦР.
4. Перерасчет концентрации ДНК в количество бактериальных клеток.

Практическая значимость. Сконструирован молекулярно-биологический калибратор на основе плазмиды рAL-ТА со вставкой участка гена 16S рРНК *Klebsiella pneumoniae* для количественной оценки бактерий в клинических образцах с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Область применения результатов исследования. В диагностических исследованиях тест система с заранее известной концентрацией позволяет не только обнаружить возбудителя инфекции при постановке ПЦР в режиме реального времени, но и определить, количественное содержание патогенна в клиническом образце, путем сравнения его с калибровочным образцом.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae была впервые описана Карлом Фридлендером в 1882 году. Бактерия была выделена из легочной ткани больных, умерших от пневмонии (Paczosa, 2016).

K. pneumoniae, представитель семейства *Enterobacteriaceae* имеет форму толстых коротких палочек с закругленными концами, размером $0,3\text{--}1,0 \times 0,6\text{--}6,0$ мкм, в мазке расположены одиночно, в парах или коротких цепочках (Прозоркина, 2008). Бактерия является неподвижным, грамотрицательным, лактоза-ферментирующим микроорганизмом с полисахаридной капсулой (Podschun, 2007).

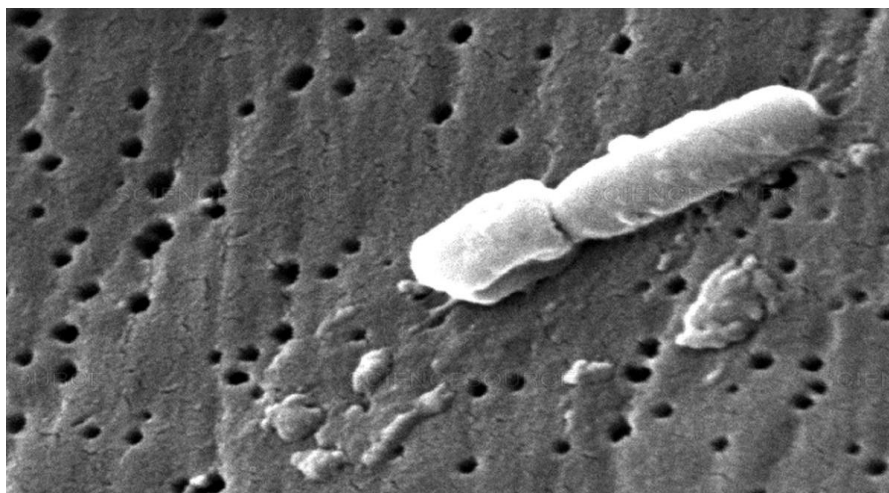


Рисунок 1 *Klebsiella pneumoniae*, сканирующая электронная микроскопия
(<https://www.sciencesource.com>)

Клебсиеллы факультативные анаэробы, хорошо растут на простых питательных средах, температурный оптимум культивирования составляет $35\text{--}37^{\circ}\text{C}$, оптимум pH – 7,2. При культивировании на плотных питательных средах различают S- и R-формы колоний. В мясопептонном бульоне S-формы дают диффузный рост, могут образовывать кольцевидный осадок, R-формы вызывают небольшие помутнения культуральной жидкости и образуют осадок в виде зерен (Лев, 2016). *K.*

pneumoniae ферментирует углеводы: лактозу, глюкозу, сахарозу, седонит и инозид с выделением газов и гидролизует мочевины. Основным дифференциальным признаком бактерии, это использование цитрата в качестве источника углерода. Протеолитическая активность слабо выражена – сероводород не образует, не выделяет индол (Соволодский, 1994).

Бактерия размножается на поверхности слизистых оболочек ротоглотки и желудочно-кишечного тракта. Проникая в кровоток, *K. pneumoniae* становится высоковирулентной и быстро приобретает устойчивость к антибиотикам (Фесенко, 2019).

Полисахаридная капсула является ключевым фактором вирулентности микроорганизма (Christopher, 2014). Она способна противостоять фагоцитозу, и позволяет бактерии уклоняться от иммунной системы макроорганизма, главной задачей которой является уничтожение возбудителя. Капсула также гарантирует бактерии устойчивость в окружающей среде (Bei Li, 2014).

Вторым немало важным фактором вирулентности являются липополисахариды – структурные составляющие клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Липополисахариды запускают каскад системной воспалительной реакции при сепсисе.

Возбудитель проникает в клетки хозяина с помощью адгезинов. Низкомолекулярные вещества - сидерофоры важны бактерии при генерализации инфекции, они поглощают ионы железа макроорганизма (Esposito, 2018).

1.2. Клиническое значение

Klebsiella pneumoniae является одним из наиболее важных условно-патогенных микроорганизмов, ассоциированных с внутрибольничными и внебольничными инфекциями (Ariadna, 2014).

Бактерию выявляют в большинстве случаев у лиц с расстройством питания, с приобретенными, постоянными заболеваниями, такими как алкоголизм,

обструктивная болезнь легких, сахарный диабет, сердечная недостаточность и цирроз печени (Walter, 2018).

Некоторые штаммы *K. pneumoniae* действуют как условно-патогенные микроорганизмы, заражая тяжелобольных и иммунокомпрометированных пациентов. Эти микроорганизмы являются общей причиной заболеваний, связанных с пневмонией, инфекциями мочевыводящих путей и инфекциями кровотока. Другие штаммы *K. pneumoniae* являются гипервирулентными, заражают здоровых людей в общественных условиях и вызывают тяжелые инфекции, включая пиогенный абсцесс печени, менингит и эндофтальмит. Третья группа *K. pneumoniae* кодируют карбапенемы, что делает их высоко устойчивыми к антибиотикам. Эти штаммы действуют как оппортунисты и чрезвычайно трудно поддаются лечению (Rebekah, 2018).

Пневмония, вызванная клебсиеллой, возникает обычно у людей болеющих хроническим алкоголизмом, сахарным диабетом и циррозом печени. Также пневмония возникает на фоне иммунодепрессии после тяжелых операций. Характерно острое начало заболевания: тяжелая интоксикация, дыхательная недостаточность, желеобразная мокрота с запахом пригорелого мяса. Рентгенологически болезнь часто проявляется поражением верхней доли с хорошо подчеркнутой междолевой бороздой. Возможно развитие одиночного абсцесса (Бараховская, 2017). Пневмония, вызванная *K. pneumoniae*, можно разделить на две категории: внебольничная или госпитальная пневмония. На Западе внебольничная пневмония, вызванная *K. pneumoniae* встречается довольно редко, по оценкам, примерно 3-5% всей внебольничной пневмонии, но в развивающихся странах, таких как Африка, она может составлять примерно 15% всех случаев пневмонии. В целом на *K. pneumoniae* приходится примерно 11,8% всех госпитальных пневмоний в мире. У больных, у которых пневмония развивается на аппарате ИВЛ, от 8 до 12% вызвана *K. pneumoniae*, 7% встречаются у тех пациентов, которые не вентилируются. Смертность колеблется от 50% до 100% у пациентов с алкоголизмом и сепсисом (John, 2020).

Развитию оппортунистических инфекций связанных с данным микроорганизмом способствуют такие оперативные вмешательства как применение антимикробных препаратов, особенно широкого спектра действия, использование в медицинской практике искусственных протезов, которые представляют отличную среду для колонизации и образования биопленок. Идеальные условия для микроба создаются в медицинских учреждениях, прежде всего в многопрофильных стационарах, что приводит к селекции и распространению нозокомиальных штаммов. Оппортунистическая *K. pneumoniae* в основном поражает лица с ослабленным иммунитетом (Козлова, 2018).

Важно знать, что впервые дни после рождения, в кишечнике ребенка размножается *K. pneumoniae*, при этом главным источником бактерии считается мать и медицинский персонал роддомов. Лечение в случае обнаружения клебсиелл в кишечном тракте не требуется. В 1 г кала здорового человека насчитывается до 10^5 *K. pneumoniae*.

Также следует учитывать, что при воздействие внешних неблагоприятных факторов на организм происходит дисбаланс органов желудочно-кишечного тракта, в результате чего в организме увеличивается количество *K. pneumoniae*, в связи с этим развивается воспалительный процесс. Одна из главных причин нарушения функций органов ЖКТ, это неразумное назначение антибиотиков, которые пагубно влияют на микрофлору кишечника. Вещества антибактериального эффекта подавляют рост не только патогенных микроорганизмов, но и бактерий нормальной флоры. Вследствие чего размножаются условно-патогенные бактерии, в том числе и клебсиеллы (Щербаков, 2003).

1.3. Микробиологическая диагностика

Микробиологическая диагностика заболеваний связанных с инфекционно-воспалительными процессами включает два основных подхода:

1) бактериологический, идентификация микроорганизма происходит после его окрашивания или культивирования;

2) серологический, определение бактерий происходит по обнаружению антител к микроорганизму в плазме пациента (Левинсон, 2015).

1.3.1 Бактериологический метод исследования

Бактериологический метод исследования предусматривает выделение чистой культуры возбудителя. При диагностике *Klebsiella pneumoniae* материалом для бактериологического исследования служат: мокрота, моча, испражнения, кровь, гной, в зависимости от локализации воспалительного процесса в организме. На дифференциальные питательные среды содержащие лактозу производят посев исследуемого материала, с последующим выделением чистой культуры возбудителя и его определением видовой принадлежности (Воробьев, 2012).

Биоматериал, доставленный в бактериологическую лабораторию, подвергается первоначальному микроскопическому исследованию. Главной целью микроскопического исследования является обнаружение в исследуемом материале микроорганизмов. Результат первичной микроскопии дает ориентировочное представление о присутствии в клиническом материале возбудителя заболевания (Донецкая, 2011).

При микроскопии бактерий их окрашивают и изучают морфологические и тинкториальные свойства. При этом определяют форму, размер и взаимное расположение бактериальных клеток. Используя различные методы окраски, выявляют тинкториальные особенности и отдельные структуры бактериальной клетки (при окраске по Граму — свойства клеточных стенок, по Бурри–Гинсу — наличие капсулы, по Ауески — споры и др.) (Зверева, 2016).

Для обнаружения микроорганизмов рода *Klebsiella* в исследуемом образце, готовят мазки, фиксируют их, после окрашивают по Граму. *Klebsiella* в мазках похожа на короткие, толстые палочки (Поздеев О.К., 2001).

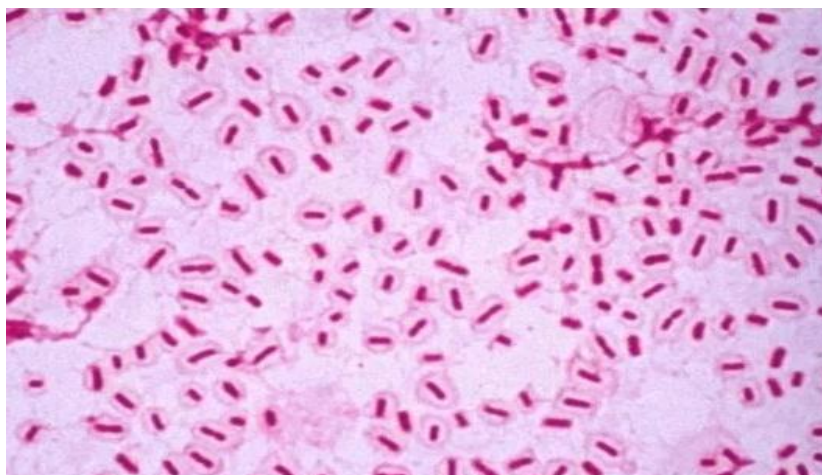


Рисунок 2 *Klebsiella pneumoniae* окрашенная по Граму (Воробьев, 2012)

При выделении бактерий рода *Klebsiella*, образцы засевают на МПА, на среду Эндо, Плоскирева, Мак-Конки и Левина, с последующей инкубацией в термостате при температуре 37°C на протяжении 18-24 часов. На среде Эндо образуются красные и розовые слизистые колонии, на среде Плоскирева – красные, розовые или бесцветные колонии, на среде Мак-Конки – красные или розовые, на среде Левина – темно-синие с блеском колонии (Бульканова, 2004).



Рисунок 3 *Klebsiella pneumoniae* на среде Мак-Конки (Tharwat Baban , 2017)

С целью выделения чистой культуры, сомнительные колонии пересевают на скошенный агар и среду Ворфель – Фергюсона. Для определения биохимических свойств микроорганизма и его подвижности, пересев производят на комбинированную среду Рассела или среду с мочевиной. Для обнаружения образования индола и сероводорода используют полоски бумаги, пропитанные реактивами.

Если культура ферментирует лактозу, глюкозу, мочевины и не образует индола и сероводорода, делают посев на среды содержащие цитрат и малонат. Для определения наличия капсулы, мазки с культурой окрашивают по Бурри-Гинсу. При наличии капсулы ставят реакцию пластинчатой агглютинации на стекле с агглютинирующими К-сыворотками, если реакция будет положительной, можно выдать ориентировочный ответ о наличии клебсиеллы. На среде с цитратом и малонатом производят учет результатов посева, выдают окончательный ответ (Черкес, 1980).

1.3.2 Серологический метод исследования

Серологический метод представляет собой совокупность реакций, основанных на взаимодействии антиген (АГ) – антитело (АТ) и направленных на выявление в сыворотке крови и других жидкостях организма антител к антигенам возбудителей инфекционных болезней, либо собственно микробных антигенов. Серологический метод характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью (Романовская, 2017).

Использование серологических реакций происходит с целью:

1. Обнаружения антител в сыворотке крови больного. В данном случае сыворотка крови выступает в качестве неизвестного компонента, так как антигены при постановке реакции заранее известны. Наличие в сыворотке крови антител соответствующих используемому антигену, говорит о положительном результате реакции; отсутствие антител в крови показывает отрицательный

результат. При диагностике инфекционных заболеваний, антигенами выступают живые или убитые бактерии (Кишкун, 2009).

2. Определения наличия в клиническом образце специфического, чужеродного агента или установление видовой принадлежности чистой культуры возбудителя. Данная реакция осуществляется с помощью иммунной сыворотки, в которой содержатся антитела (Комкова, 2006).

Серодиагностика бактерий рода *Klebsiella* проводят в реакции склеивания комплимента (РСК) с сыворотками больных и О-антигеном клибсиелл (Борисов, 2005).

Комплемент способен связываться с комплексом антиген-антитело. Образование комплексов антиген – антитело и фиксация комплимента не сопровождается видимыми изменениями (Новиков, 2002). Гемолитическая система, состоящая из гемолитической сыворотки и эритроцитов барана, вводится с целью выявления связывания комплемента с комплексом (Госманов, 2017). РСК ставят в два этапа, и в ней участвуют две системы – диагностическая и индикаторная. Диагностическая система состоит из исследуемой сыворотки, прогретая перед началом постановки реакции, антигена и комплимента. Индикаторная система состоит из исследуемой сыворотки, гемолитической системы и комплимента (Коротяев, 2017).

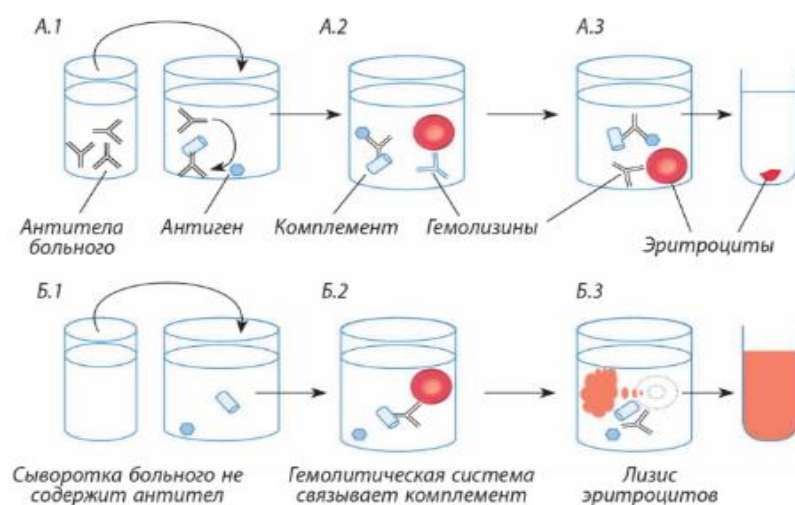


Рисунок 4 Реакция связывания комплимента (Широбокова В. П., 2015).

В первой реакции связывание комплимента происходит при образовании комплекса АГ-АТ, и тогда во второй реакции гемолиз сенсibilизированных АТ эритроцитов не произойдет, реакция считается положительной. В том случае если в исследуемом образце отсутствует соответствие АГ и АТ, комплимент остается свободным и во второй реакции присоединяется к комплексу эритроцит АТ, вызывая гемолиз, реакция считается отрицательной (Воробьева 2003).

Также с целью быстрого установления видовой принадлежности бактерии, проводят идентификацию по антигенным свойствам. Каждый микроорганизм в своем составе имеет различные антигенные субстанции. В частности, представители семейства энтеробактерий содержат оболочковый О-антиген, жгутиковый Н-антиген и капсульный К-антиген, которые можно определить с помощью специфических агглютиногенных сывороток. Чаще всего используется ориентировочная реакция агглютинации (РА) на стекле (Есаулов, 2015).

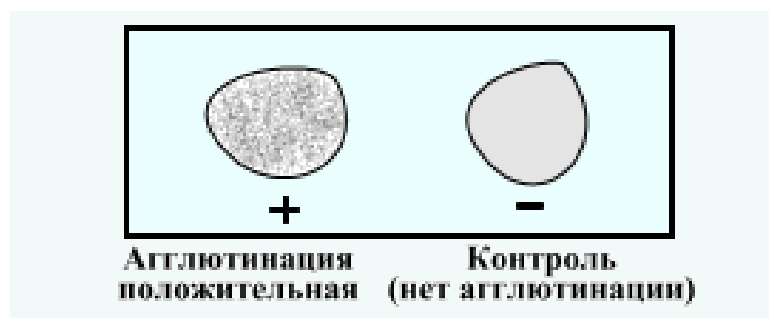


Рисунок 5 Пластинчатая реакция агглютинации (Будачеа, 2012)

Пластинчатая РА ставится на стекле. На стекло наносят каплю сыворотки, в которую вносят изучаемую культуру бактерий, перемешивают и через 2 – 3 минуты наблюдается появление мелкозернистой или хлопьевидной агглютинации. В качестве контроля используют каплю физиологического раствора, в которой после внесения бактерий наблюдается равномерное помутнение. Данная реакция используется как экспресс-метод для обнаружения антител или установления микроорганизмов (Будачеа, 2012).

1. 4. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Среди методов, основанных на молекулярной биологии, полимеразная цепная реакция (ПЦР) является превосходным способом для быстрого обнаружения патогенов. ПЦР была разработана в 1983 году Кэри Маллисом, американским биохимиком, который получил Нобелевскую премию по химии в 1993 году за свое изобретение (Encyclopaedia Britannica, 2019).

В основе ПЦР-метода лежит многократное, избирательное копирование определенного участка ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы в условиях *in vitro* (Щелкунов, 2004). Преимуществом ПЦР является то, что количество матричных ДНК не является лимитирующим фактором. Таким образом, можно амплифицировать нуклеотидные последовательности из малого количества ДНК (Karim, 2019).

При ПЦР-диагностике размножению подвергается определенная, специфическая нуклеотидная последовательность ДНК бактерии, которая характерна лишь для данного возбудителя инфекции (Avashia, 2013).

ПЦР включает в себя три этапа: пробоподготовка, т.е. приготовление реакционной смеси, амплификация (увеличения количества участков ДНК) и регистрация полученных результатов (Лабинская, 2016).

Реакционная смесь обычно содержит матричную ДНК, четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата dATP, dCTP, dGTP и TTP, Taq-полимеразу и два синтетических олигодезоксирибонуклеотидных праймера, длина которых составляет 15-30 нуклеотидов. Нуклеотиды комплементарны участкам противоположных цепей ДНК, примыкающих к исследуемому фрагменту ДНК-матрицы (Патрушев, 2004).

Амплификация определенного фрагмента проходит множество циклов, но каждый из них состоит из трёх стадий: денатурация, отжиг, элонгация.

1. Денатурация проводится при температурном режиме 92-95°C. В процессе нагревания, происходит разрушение водородных связей между молекулами двухцепочечной ДНК-матрицы. В результате денатурации образуется две одноцепочечные молекулы ДНК.

2. Отжиг протекает в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа. Праймеры присоединяются к комплементарным последовательностям на противоположных цепях ДНК, вблизи специфического фрагмента. Отжиг происходит при температуре 37-65°C (Колотова, 2019).

3. Комплементарное достраивание цепей ДНК происходит в процессе элонгации. Начиная с участков, где присутствуют праймеры, цепи достраиваются в противоположных направлениях от 5'-конца к 3'-концу. Процесс синтеза катализируется ферментом ДНК-полимеразой и проходит при температурном режиме 70-72°C. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Матрицами для второго цикла амплификации, служат новые цепи ДНК образовавшиеся в первом цикле. Во втором цикле происходит образование специфического фрагмента ДНК – ампликона, размер которого ограничен праймерами (Меньшикова, 2009).

На третьем этапе для того, чтобы проверить качество и количество продуктов ПЦР, как правило, в большинстве случаев используют электрофоретическое разделение ПЦР-амплификационной смеси на окрашенном бромистым этидием агарозном или полиакриламидном геле (Скриган, 2019).

На сегодняшний день ПЦР применяется в диагностике и дает возможность идентифицировать микроорганизмы непосредственно в клиническом материале без предварительного выделения чистой культуры (Давлетшина, 2018).

1. 4. 1 ПЦР в реальном времени (РТ-ПЦР)

При постановке ПЦР в режиме реального времени используют флуоресцентные молекулы, которые дают возможность контролировать продукты амплификации во время каждого цикла реакции (Navarroa, 2014).

ПЦР «в реальном времени» включает в себя одновременную детекцию и количественное определение специфической последовательности ДНК в образце (Нургалиева, 2013). Метод РТ-ПЦР основан на использовании флуорохромов – молекул, обладающих способностью к свечению в результате поглощения световой энергии (Бикбулатова, 2012). Путем измерения флуоресцентного сигнала с помощью интеркалирующих красителей или специфических зондов с двойной меткой контролируется непрерывное образование продуктов ПЦР в течение всей амплификации (Kralik, 2017).

Специальными компонентами реакционной смеси являются флуоресцентные зонды. Флуоресцентный зонд - это олигонуклеотид, комплементарный последовательности амплифицируемого участка ДНК. В положении 3'-конец располагается флуоресцентная молекула - флуорофор, а на противоположном конце 5' помещен флуоресцентный гаситель. Благодаря близкому расположению флуорофора и гасителя вся энергия, поглощаемая флуорофором, перемещается на гаситель по принципу передачи энергии флуоресцентного резонанса. Однако сигнал флуоресценции отсутствует (Лопухов, 2000).

В ходе РТ-ПЦР при нагревании происходит денатурация ДНК-матрицы. После денатурации зонд и праймеры связывается с комплементарным участком ДНК. При синтезе новой цепи ДНК, фермент ДНК-полимераза расщепляет зонд. В связи с расщеплением зонда флуорофор и гаситель отдаляются друг от друга, увеличивая между собой расстояние. В этот момент можно зарегистрировать флуоресцентный сигнал от флуорофора (Ricchi, 2012).

Процесс амплификации принято разделять на три основные стадии ПЦР:

1) стадия экспоненциального накопления, во время которой эффективность амплификации максимальна;

2) стадия выхода на плато (линейная фаза), эффективность амплификации постепенно снижается;

3) стадия плато, при которой прекращается накопление продукта амплификации (Yuan, 2006).

Сигнал флуоресценции в ходе РТ-ПЦР возрастает пропорционально количеству продукта амплификации, чем больше количество ДНК в образце, тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл (Arya et al., 2005).

В РТ-ПЦР отсутствует стадия электрофореза, благодаря этому уменьшается число ложноположительных результатов, так как риск загрязнения продукта ПЦР минимальный (Гильмиярова, 2017).

Плюсом ПЦР в режиме реального времени является возможность проведения количественного анализа. При количественном исследовании клинических материалов амплификация проводится в присутствии калибровочных образцов, в которых заранее известно количество копий ДНК. Сравнение кинетики накопления продуктов амплификации в экспериментальных и контрольных образцах позволяет оценить концентрацию ДНК в диапазоне разведений контрольных препаратов ДНК (Ребриков, 2015).

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы исследования

Для проведения молекулярно-генетического исследования была взята чистая культура *Klebsiella pneumoniae* с музейного штамма клиник БГМУ. Посев с целью накопления культуры был произведен на скошенный мясо-пептонный агар. Культивирование бактерии проводилась при температурном режиме 37°C в течение 24 часов. Ниже приведена, кратка характеристика *K. pneumoniae*.

- *Klebsiella pneumoniae* – это не образующие спор неподвижные бациллы, локализованные в полисахаридной капсуле, которая является характерным морфологическим признаком данной бактерии. Клебсиеллы хорошо растут на простых мясных средах, образуя на поверхности крупные, куполообразные, слизистые колонии.

Помимо *K. pneumoniae* в исследование были задействованы плазмидный вектор pAL-TA и компетентные клетки *Escherichia coli*.

- Плазмидный вектор pAL-TA предназначен для быстрого клонирования продуктов ПЦР без предварительной обработки рестриктазами или экзонуклеазами. Вектор является линейаризованной плазмидой с выступающими фосфорилированными 3'-концевыми тимидинами. Taq-полимеразы способны добавлять на 3'-конец синтезированной цепи ДНК дезоксиаденозин, это способствует эффективному лигированию ПЦР-продукта в pAL-TA вектор. Таким образом, продукт ПЦР и pAL-TA вектор несут выступающие комплементарные 3'-концевые нуклеотиды А:Т. Наличие таких «липких» концов обеспечивает высокую эффективность лигирования.

Основные свойства pAL-TA вектора:

1. Не требуется дополнительная обработка при клонирование ПЦР-продуктов в вектор;
2. В pAL-TA присутствует ген устойчивости к ампициллину;
3. Вектор обеспечивает возможность бело-голубой селекции клонов;

4. Вектор можно использовать для клонирования как индивидуальных ампликонов, так и сложных смесей;

5. Возможен отбор рекомбинантных клонов путем ПЦР-скрининга бактериальных колоний с использованием стандартной пары праймеров;

6. Растворённый в воде pAL-TA вектор выдерживает не менее 10-15 циклов размораживания/замораживания без снижения эффективности клонирования;

7. Рекомендуемый размер вставки — до 1 500 п.о.

• *Escherichia coli* представляют собой полиморфные прямые или слегка изогнутые палочки с закругленными концами, размером 0,4-0,6×2,0-6,0 мкм. Палочки располагаются одиночно, реже – попарно, спор не образуют. Клетки *E. coli* имеют, пили и обладают подвижностью благодаря жгутикам, которые расположены по всей окружности бактерии.

Эшерихии являются аэробами или факультативными анаэробами. Оптимальная температура роста 35-37°C, растут на простых питательных средах. На МПА микроорганизм образует колонии средних размеров, серо-белого цвета с гладкой, блестящей поверхностью и ровными краями. В МПБ вызывают помутнение, иногда образуют незначительный осадок. *E. coli* обладают высокой биохимической активностью – ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, мальтозу, арабинозу, галактозу, маннит. Характерным признаком эшерихий является ферментация лактозы. По способности ферментировать лактозу различают лактозоположительные и лактозоотрицательные кишечные палочки. В качестве дифференциально-диагностических сред при выделении кишечной палочки используют среды, содержащие лактозу (среды Эндо, Левина, Плоскирева).

2.2 Культивирование и приготовление питательных сред для энтеробактерий: *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*

Энтеробактерии – факультативные анаэробы, большинство из них нетребовательны к питательным средам и хорошо растут на простом питательном агаре, культивируются при 37°C.

1) Мясо-пептонный бульон - жидкая питательная среда для культивирования микробов, состоящая из мясной воды и пептона.

- Приготовление мясо-пептонного бульона (МПБ).

К приготовленной мясной воде 100 мл прибавляли 1 % пептона и 0,5 % хлористого натрия, кипятили 1 - 2 мин. при помешивании, затем охлаждали и определяли pH. Добавляли щелочи (гидроксид натрия) или кислоты (соляная кислота) устанавливали pH среды 7,4-7,6. Кипятили 30-45 мин. для выпадения осадка, затем охлаждали, фильтровали через бумажный фильтр и доливали водой до первоначального объема. Проверили и доводили pH до 7,4-7,6, разливали по пробиркам и стерилизовали в автоклаве при 120°C в течение 15-20 мин.

Колонии *K. pneumoniae* и *E. coli* на МПБ образуют диффузное помутнение и природный осадок.

2) Мясо-пептонный агар - плотная или полужидкая универсальная питательная среда, состоящая из мясо-пептонного бульона с добавлением 0,5-2% агара и применяемая для выращивания большинства патогенных микробов.

- Приготовление мясо-пептонного агара (МПА).

К мясопептонному бульону добавляли 15-20г мелко нарезанного хорошо промытого агара. Смесь прогревали в автоклаве до полного растворения агара, устанавливали слабощелочную реакцию среды 20%-ным раствором Na_2CO_3 . Разливали через стеклянную воронку с резинкой и зажимом в пробирки следя за тем, чтобы не смочить их края. Стерилизовали в автоклаве при температуре 120°C в течение 15-20 мин. Пробирки с горячим жидким агаром извлекали из автоклава и раскладывали на столе в наклонном положении. Агар растекается по стенке

пробирки и при застывании получается «скошенным». Для получения агара «столбиком» пробирки охлаждают в вертикальном положении. На поверхности МПА *K. pneumoniae* образует куполообразные крупные слизистые колонии, *E. Coli* серо-белые, гладкие, влажные, с ровными краями (S-форма). Данный МПА использовался для накопления чистой культуры *K. pneumoniae*.

- Приготовление среды Эндо.

К предварительно расплавленному мясо-пептонному агару в количестве 100 мл, добавляли 1 г лактозы. Прежде чем добавить лактозу ее растворили, прокипятили в 5 мл дистиллированной воды, и 1 мл насыщенного спиртового фуксина, обесцвеченного перед добавлением к агару 10%-м водным раствором сульфата натрия до бледно-розового оттенка. Среду хорошо перемешивали, разливали в стерильные чашки и перед посевом подсушивали в термостате. Бактерии *E. coli*, ферментирующие лактозу с образованием кислоты, формируют на этой среде блестящие, темно-красные колонии с металлическим блеском, *K. pneumoniae* блестящие колонии средних размеров или малиново-черного цвета.

2.3 Выделение бактериальной ДНК из бактерий

Для выделения бактериальной ДНК из выросших колоний использовали ионообменную смолу Chelex100, приготовленную с использованием следующих реагентов: Triton X-100 (1%), Tween-20 (1%), Chelex 100, TRISHCl (pH 9,1, 100 mM), крезоловый красный, ddH₂O. Для этого растворить 0,5 г Chelex 100, 5 мл TRIS-HCl и 0,5 мл Triton X-100 в 50 мл в ddH₂O. Добавляли щепотку красителя крезоловый красный и перемешивали до полного растворения. Готовый реактив постоянно ресуспендировали для растворения частичек, осевших на дно. Реагент хранили при температуре +4°C.

Ход работы:

Подготовили и поставили в штатив пробирку с отобранными бактериальными колониями, одноразовую стерильную пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл, промаркировали.

1. В пробирку с колониями одним наконечником добавили 200 мкл реактива.
 2. Тщательно ресуспендировали пробирку на вортексе и затем помещали в термостат с температурой 95°C на 10 минут. После окончания инкубации повторно перемешивали содержимое пробирки на вортексе.
 3. Центрифугировали пробу при 12 тыс об/мин в течение 5 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержала в себе очищенную ДНК, готовую к постановке ПЦР.
- В дальнейшем полученную ДНК использовали в качестве матрицы для амплификации нужного участка гена 16S рРНК, выявляемого методом ПЦР.

2.4 Проведение стандартной полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Амплификацию участков ДНК осуществляли с использованием стандартных наборов на амплификаторе «Терцик МС-2».

Ход работы:

1. В штативе расположили dNTP, буфер, растворы праймеров, Taq-полимеразу. Taq-полимеразу необходимо хранить в морозильнике, избегать долгого нахождения на рабочем месте без холодного штатива.
2. Отобрали необходимое количество одноразовых стерильных пробирок объемом 0,2 мл, промаркировали и расставили в штатив соответствующим образом.
3. Приготовили амплификационную смесь для общего количества анализируемых проб в пробирке на 1,5 мл и разлили по 30 мкл в каждую пробирку для амплификации на 0,2 мл. Состав реакционной смеси для 1 пробирки: dNTP – 3 мкл, буфер – 3 мкл, праймеры каждый по 1 мкл (2 праймера по 1 о.е.), mQ – 20 мкл, , Taq-полимеразу – 1мкл.
4. В каждую пробирку внесли по 1 мкл ДНК исследуемого образца, используя отдельный наконечник для каждой пробы.
5. На поверхность каждой реакционной смеси наслаивали 1 каплю минерального масла, во избежание испарения жидкости.

6. Пробирки закрывали, центрифугировали 5 с при 3000 об/мин на микроцентрифуге-вортекс.

7. Переносили пробирки в прогретый до 94°C амплификатор.

8. На ДНК-амплификаторе запускали необходимую программу со следующими параметрами:

	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95 °C	1 мин	1
Денатурация	95 °C	15 сек	40
Отжиг	63 °C	30 сек	
Элонгация	72 °C	40 сек	
Достраивание цепей ДНК	72 °C	30 сек	1

2.5 Детекция результатов ПЦР

Детекция продуктов амплификации осуществлялась электрофоретическим способом путем окрашивания агарозного геля бромистым этидием с последующей визуализацией при освещении УФ.

Агарозный гель-электрофорез проводили по следующей схеме:

1. Приготовили 1 л 2х-ного ТАЕ буфера путем разбавления 50хного ТАЕ буфера в дистиллированной воде. К 20 мл 50х-ного ТАЕ буфера добавить 980 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешали.

2. Взвесили 1,7 г агарозы и добавили 2 мл 50х-ного ТАЕ буфера, перемешали и расплавили смесь в микроволновой печи в течение 2-3 минут, периодически помешивая. Смесь в колбе должна стать прозрачного цвета.

3. Разливали агарозу на ровной поверхности в специальную форму с одной или двумя пластиковыми гребенками, при этом толщина геля была не менее 2 мм и не

более 5 мм. Гель полностью застывает и может быть использован после 15-20 минут.

4. Наливали в камеру для электрофореза необходимое количество 2х-ного ТАЕ буфера и помещали в него застывший гель. Буфер должен полностью покрывать гель сверху на 2-10 мм.

5. Медленно наносили дозатором пробу ДНК с красителем в лунку геля.

6. Подключали клеммы прибора к источнику питания так, чтобы (–) находился на старте, а (+) – на финише.

8. Запускали электрофорез при помощи источника питания при следующих параметрах: сила тока 400 мА, мощность 80Вт, напряжение 120 В. На старте пузырей должно быть больше, чем на финише. Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя.

9. Электрофорез проводили в течение 20 минут, затем вынимали гель из формы и помещали на поднос для окрашивания. Наливали в поднос слабый раствор бромистого этидия. Окрашивание проходило в течение 5-7 мин.

10. Краситель смывали в колбу и промывали гель проточной водой. Гель помещали на фильтр трансиллюминатора, который излучает свет в ультрафиолетовом диапазоне (254–310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм).

2. 6 Молекулярное клонирование

В основе молекулярного клонирования лежит встраивание определенного фрагмента ДНК в вектор, который способен включать в себя новые последовательности и обеспечивать их перенос в системы *in vitro*, где ДНК будет воспроизводиться, давая начало новому клону клеток.

Вектор – это молекула ДНК, способная самостоятельно реплицироваться в клетках и обеспечивать клонирование и экспрессию встроенного в неё искусственно какого-либо гена.

Вектор должен соответствовать определенным требованиям:

1. Вектор должен содержать последовательности нуклеотидов, обеспечивающие не только его собственную репликацию, но и воспроизведение встроенной в него вставки чужеродной ДНК.
2. Наличие в структуре вектора уникального сайта для эндонуклеазы рестрикции, по которому происходит встраивание вставки ДНК.
3. Наличие маркера в структуре ДНК вектора, который кодирует белки отсутствующие в клетках реципиента, например – белки, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам. Это обеспечивает возможность вести отбор клонов, содержащих вектор со встроенной вставкой ДНК.
4. Небольшой размер ДНК вектора.
5. Достаточная копияность в клетке-хозяине.

Принцип клонирования плазмидного вектора, заключается в расщепление ДНК плазмиды рестриктирующей эндонуклеазой и соединение ее с чужеродной ДНК. Затем получившиеся рекомбинантными плазмиды трансформируют в бактерии.

- Создание рекомбинантной ДНК. Проводилась рестрикция выделенной ДНК с помощью рестриктазы. Рестриктаза - это фермент, с помощью которого катализируется реакция гидролиза нуклеиновых кислот.

Затем посредством водородных связей липкие концы плазмидного вектора и образца ДНК слипаются, но поскольку нуклеотиды не способны образовывать фосфодиэфирные связи, остается разрыв на векторе. Для того чтобы убрать разрыв, добавляли ДНК-лигазу, которая образует фосфодиэфирные связи в новой гибридной молекуле ДНК, после чего вектор готов.

- Трансформация – способность бактериальной клетки поглощать молекулы ДНК. К культуре *E.coli* добавляли плазмидный вектор, который встраивался в

бактериальные клетки. Клетки подвергались температурному воздействию и обрабатывались раствором CaCl_2 . В результате такой обработки происходило разрушение клеточной стенки, что облегчало проникновение ДНК в клетку.

Скрининг трансформированных клонов. После трансформации образуются клоны содержащие плазмидный вектор, для их обнаружения трансформанты высевали на среду содержащую маркер устойчивости к ампицилину. После инкубирования отбирали бесцветные колонии (содержащие вставку в плазмиде искомой последовательности). Отбор клонов осуществлялся реакцией ПЦР на исследуемые вставки. Детекция амплифицированного ПЦР-продукта осуществлялось так же с помощью электрофореза. При наличии необходимой вставки, ПЦР продукт использовался в дальнейшем.

2.7 Выделение плазмидной ДНК

При выделении плазмидной ДНК использовался набор GeneJET Plasmid Miniprep Kit.

Процесс выделения разделен на 4 этапа:

1) К культуре клеток предварительно внесенных в стерильную одноразовую пробирку добавляли 250 мкл ресуспендирующего раствора, встряхивали, добавляли 250 мкл лизирующего раствора и переворачивали пробирку 4-6 раз, после 350 мкл нейтрализующего раствора и переворачивали пробирку 4-6 раз. Центрифугировали 5 минут.

2) Загружали супернатант в спин-колонку GeneJET и центрифугировали 1 мин при 11000 об/мин.

3) После центрифугирования промывали колонку и добавляли 500 мкл промывочного раствора, центрифугировали 30-60 секунд при 11000 об/мин. Повторяли данный процесс 2 раза.

4) Колонку после промывки переносили в новую стерильную пробирку. Добавляли 50мкл элюирующего буфера и инкубировали 2 мин при комнатной температуре, после центрифугировали 2 мин при 11000об/мин.

2.8 Метод серийных разведений

В 10 подготовленных промаркированных одноразовых стерильных пробирок внесли по 90 мкл mQ. В первую пробирку добавили 10 мкл суспензии выделенной плазмидной ДНК, перемешали на вортексе, после сбросили капли со стенок пробирки, оставили на 5 мин в штативе. Во вторую пробирку добавили 10 мкл раствора из первой пробирки. Перемешали на вортексе, сбросили капли и оставили на 5 мин в штативе. С последующими пробирками процесс повторяли.

2.9 Подсчет концентрации ДНК

Подсчет концентрации ДНК проводился с помощью Thermo Scientific NanoDrop 1000. Спектрофотометр позволяет определения концентрацию и чистоту нуклеиновых кислот. Для проведения спектрофотометрического анализа каплю образца в объеме 1 мкл наносили на неподвижный модуль прибора. Сверху на каплю опускали подвижный модуль прибора, в результате чего из образца формировался столбик жидкости между подвижным и неподвижным модулями. Система автоматически подбирала длину оптического пути от 0,05 мм до 1 мм, оптимальную для данного материала. Измерение проводилось при длине волны в диапазоне 190 – 840 нм. В результате концентрация образца составила 4,7 нанограмм.

2.10 Проведение ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР)

ПЦР в режиме реального времени проводили с помощью детектирующего амплификатора CFX96 Touch "REAL TIME" (Bio-Rad, США). Учет результатов проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. В реакции амплификации участвовали 10 проб, в каждой пробирке по 14 мкл плазмидной ДНК.

Ход работы:

1) Приготовили амплификационную смесь для общего количества анализируемых проб в пробирке на 1,5 мл и разлили по 11 мкл в каждую пробирку на 0,2 мл. Состав реакционной смеси для 1 пробирки: dNTP – 2,5 мкл, буфер – 2,5 мкл, праймеры каждый по 1 мкл (2 праймера по 1 о.е.), mQ – 1,2 мкл, Taq-полимеразу – 0,3 мкл.

2) Используя отдельный наконечник для каждой пробы, внесли по 14 мкл ДНК исследуемого образца.

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

4) На приборе указывали параметры: размер, тип, режим сканирования, флуорофор, названия проб, указывали объем реакционной смеси в одной пробирке. Затем запускали программу со следующими параметрами:

	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95 °C	5 мин	1
Денатурация	95 °C	10 сек	35
Отжиг	63 °C	25 сек	
Элонгация	72 °C	30 сек	
Достраивание цепей ДНК	72 °C	30 сек	1

5) По окончании амплификации по показателю индикаторного цикла рассчитывали количество ДНК исследуемого инфекционного агента.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование калибратора для количественной оценки содержания *Klebsiella pneumoniae*

Молекулярно-биологический калибратор для количественной оценки бактерий методом РТ-ПЦР был конструирован на основе плазмиды рAL-TA (3,0 т.п.н.) со вставкой участка гена 16S рРНК *Klebsiella pneumoniae*. Данная конструкция была обозначена как рAL-TAKp16S (рис. 6).

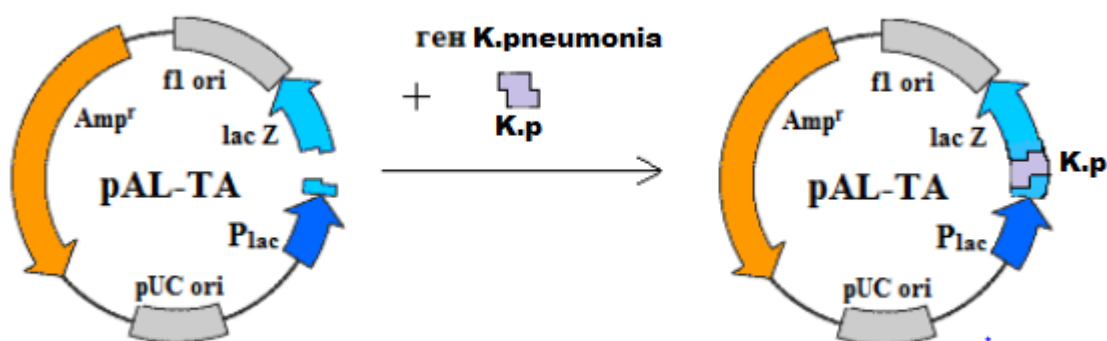


Рисунок 6 Схема конструирования калибровочного образца рAL-TAKp16S

ДНК *Klebsiella pneumoniae* выделенная с помощью ионообменной смолы Chelex100 использовалась в качестве матрицы для проведения стандартной ПЦР с целью накопления участка гена 16S рРНК *Klebsiella pneumoniae*.

Полученный фрагмент клонировали в векторную плазмиду рAL-TA. Для этого в стерильной пробирке готовили реакционную смесь для лигирования, включающую плазмидный вектор, клонируемый фрагмент, буфер для лигирования и Т4 ДНК лигазу. Реакцию инкубировали при 14°C в течение 14-16 часов.

Компетентные клетки *Escherichia coli* XL1-Blue получали путем их инкубации при низкой температуре в растворе, содержащем ионы Ca²⁺ и Mn²⁺.

1) Бактерии рассеивали в чашках Петри, заполненных агаризированной SOB, куда материал рассеивали методом штриха. Выращивание колонии проводилось при 37°C в течение суток.

2) После инкубирования 10-12 колоний диаметром от 2 до 3 мм отбирались в колбу емкостью 0,5-1 л с 40 мл жидкой среды SOB. Колба помещалась на качалку, установленную в термостате, где при температуре 37°C и интенсивном встряхивании 200–300 об/мин осуществлялось глубинное культивирование культуры в течение 2-2,5 часов до достижения оптической плотности OD₆₀₀=0,6. Все дальнейшие манипуляции проводили на льду.

3) Охлаждение после культивирования осуществлялось в течение 30 минут, после чего из колбы отбирали 30 мл культуры и центрифугировали материал в пробирке емкостью 50 мл при температуре 4°C в течение 10 минут при скорости 3000 об/мин.

4) Затем супернатант сливали и центрифугировали бактериальные клетки в течение 20 секунд при скорости 3000 об/мин.

5) После жидкую фракцию удаляли пипеткой, а осадок суспензируют в 10 мл буфера ТВ и оставляли на 10-15 минут во льду.

6) Повторяли п. 3 и п. 4.

7) Затем к культуре добавляли криопротектор диметилсульфоксид до достижения концентрации 3,5%, и сосуд выдерживали при 0°C в течение 10-15 минут.

8) Повторяли п. 3 после чего супернатант сливается.

9) Готовую культуру разливали в охлажденные стерильные пробирки по 100 мкл. Готовые компетентные клетки использовали сразу или замораживали в жидком азоте.

После этого проводили трансформацию *Escherichia coli* XL1-Blue:

1) Культуру выращивали в среде LB при 37°C до середины логарифмической фазы роста.

2) Клетки осаждали центрифугированием. Осадок ресуспендировали в 1/2 первоначального объема 10 мМ раствора CaCl_2 , выдерживали 20 мин и после центрифугирования ресуспендировали в 1/50 первоначального объема 50 мМ CaCl_2 .

3) Через 12-24 часов хранения при 2-4°C 0,2 мл суспензии клеток смешивали с 10 мкл лигированной смеси и инкубировали 30-60 минут на льду.

4) Трансформационную смесь переносили на 2 минуты в водяную баню при температуре 42°C, добавляли к суспензии 1 мл среды LB, инкубировали 1 час при 37°C, перемешивая каждые 15 минут.

5) Центрифугировали 2 минуты при скорости 4000 об./мин, отбирали 100 мкл трансформированных клеток и высевали на чашку с агаризованной средой LB, содержащей антибиотик ампициллин.

6) Чашку инкубировали в течение 16-20 часов в термостате при 37°C.

После инкубирования чашки Петри, было отобрано 5 бесцветных колоний для проведения стандартной ПЦР с целью обнаружения наличия плазмидной ДНК. Разделение продуктов амплификации осуществляли электрофоретическим методом в полиакриламидном или агарозном геле с последующей визуализацией ультрафиолетом после окраски бромистым этидием.

Скрининг трансформированных колоний проводили «сине-белым» тестом. При использовании в качестве селективного маркера гена бета-галактозидазы (плазида pAL-TA) по поверхности агаризованной среды предварительно растирали 50 мкл X-gal (20 мг/мл в диметилформамиде) и 75 мкл раствора изопропилтио-бета-D-галактозидазы (IPTG, 24 мг/мл). Выросшие после трансформации колонии, содержащие ненарушенный ген бета-галактозидазы, имели голубой цвет. Колонии белого цвета (из-за инсерции клонируемого фрагмента ДНК в ген бета-галактозидазы) не имели синей окраски.

Одну из «положительных» колоний пересеивали на чашку с агаризованной средой LB, содержащей антибиотик ампициллин и помещали в термостат при температуре 37°C на сутки.

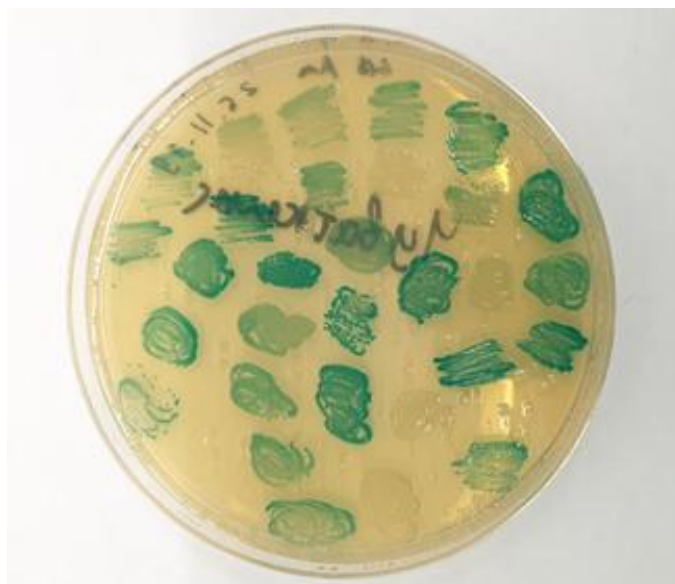


Рисунок 7 Колонии после трансформации, пересаженные на селективную питательную среду. Синие колонии не несут целевого гена, бесцветные содержат конструкцию рAL-TAKp16S.

Бактериологической петлей забирали большую часть выросших колоний для выделения плазмидной ДНК с помощью набор GeneJET Plasmid Miniprep Kit.

Затем с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США), измеряли концентрацию плазмидной ДНК в исходной пробирке, используя 1 мкл образца. В результате измерения концентрация образца составила 4,7 нанограмм.

Далее готовили множественное серийное разведение образца. Для этого подготовили 10 стерильных пробирок типа Eppendorf и в каждую добавили по 90 мкл стерильной воды. В исходную пробирку добавили 10 мкл образца и произвели десятикратное разведение в каждой пробе.

Перевод концентрации ДНК в ген-эквиваленты бактериальных клеток

Вычисление количества копий ДНК по его концентрации и размеру производили с помощью онлайн калькулятора <http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>. Известно, что размер созданной конструкции

составляет 3350 п. н. Исходный образец ДНК была подвержена серию разведений, по схеме представленной на рисунке 8.

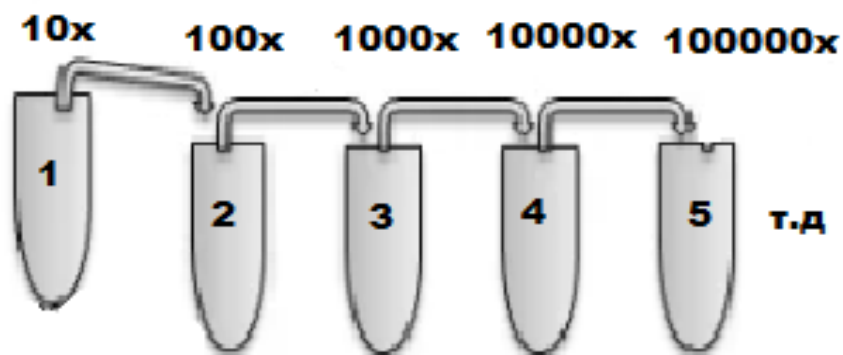


Рисунок 8 Схема разведения контрольной ДНК

Далее в каждом разведении было подсчитано количество копий ДНК. Результаты приведены в таблице 1.

№ пробы	Концентрация,	Копий ДНК/мл
1	4,7 мкг/мл	$1,28 \times 10^{12}$
2	0,47 мкг/мл	$1,28 \times 10^{11}$
3	47 нг/мл	$1,28 \times 10^{10}$
4	4,7 нг/мл	$1,28 \times 10^9$
5	0,47 нг/мл	$1,28 \times 10^8$
6	47 пг/мл	$1,28 \times 10^7$
7	4,7 пг/мл	$1,28 \times 10^6$
8	0,47 пг/мл	$1,28 \times 10^5$

Таблица 1. Концентрации и количество копий ДНК в образцах.

Каждая клетка *Klebsiella pneumoniae* содержит 7 рРНК оперонов. Для того, чтобы узнать сколько содержится ген-эквивалентности в каждой пробирке, концентрацию делили на семь.

С каждым разведением провели РТ-ПЦР для создания калибратора для подсчета концентраций бактериальных клеток в клинических образцах. На амплификацию брали 14 мкл ДНК.

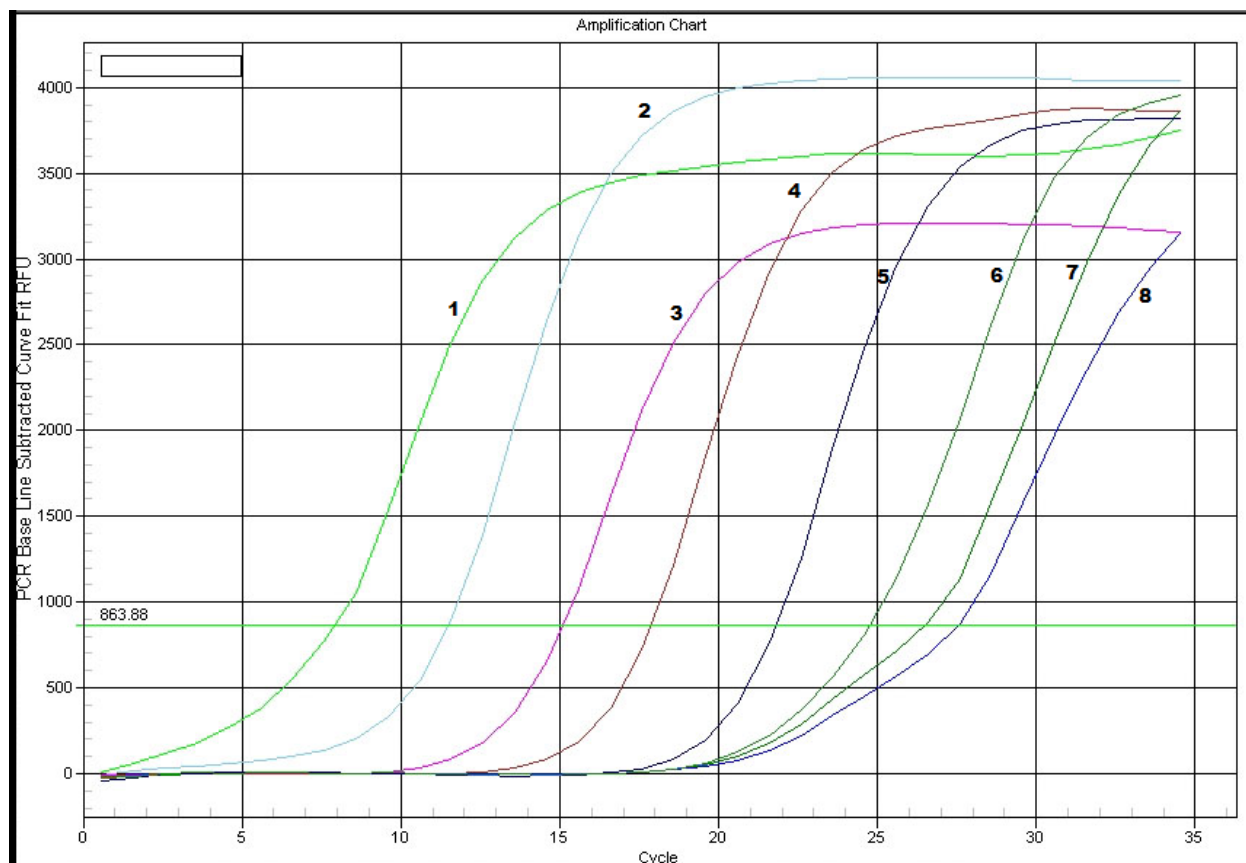


Рисунок 9 Результаты РТ-ПЦР с серией разведений ДНК. 1 образец – $2,56 \times 10^9$ г/экв, 2 образец – $2,56 \times 10^8$ г/экв, 3 образец – $2,56 \times 10^7$ г/экв, 4 проба – $2,56 \times 10^6$ г/экв, 5 образец – $2,56 \times 10^5$ г/экв, 6 образец – $2,56 \times 10^4$ г/экв, 7 образец – $2,56 \times 10^3$ г/экв, 8 образец – $2,56 \times 10^2$ г/экв.

ВЫВОДЫ

1. Получена плазмидная конструкция, содержащая фрагмент гена 16S рРНК *Klebsiella pneumoniae*.
2. Получена серия разведений с известной концентрацией плазмидной ДНК для создания молекулярно-биологического калибратора.
3. Создан прототип тест-системы с возможностью количественного определения концентрации *Klebsiella pneumoniae* в клинических образцах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бульканова Е. А., Золотухин С. Н., Митрохина Е. Н. Биологические свойства бактерий рода *Klebsiella* и их значение в патологии животных, 2004. УДК 619:579. С. 34-40.
2. Бараховская Т. В. Пневмонии: учебное пособие для студентов – Иркутск: 2017. С. 7-16.
3. Будчанов Ю. И. Реакции основанные на взаимодействии антигена с антителом – Тверь: 2012. С. 6-8.
4. Борисов Л.Б. - Медицинская микробиология, вирусология, иммунология, 2005. С. 396-398.
5. Воробьев А.А., ред. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов 2-е изд. М.: Медицинское информационное агентство; 2012. С. 360-361.
6. Воробьев А. А., Быков А. С., Пашков Е. П., Караулов А. В., Корн М. Я., Быков С. А. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: учеб. пособие для студентов мед. вузов, 2003. С. 215.
7. Гильмиярова Ф. Н., Колотьева Н. А., Гусякова О. А., Сидорова И. Ф. Плимеразная цепная реакция. История открытия. Новый этап развития, 2017. - №4. - С. 17-21.
8. Госманов Р.Г., Галиуллин А.К., Волков А.Х., Ибрагимова А.И. Микробиология 2-е изд., 2017. С. 409-410.
9. Давлетшина Г. К., Туйгунов М. М, Габидуллин Ю. З., Ахтариева А. А., Булгаков А. К., Савченко Т. А. / Микробиологические методы: учеб. пособие – Уфа: Изд-во ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2018. С. 48.
10. Донецкая Э.Г.-А. - Клиническая микробиология. 2011.
11. Есаулов А. С., Митрофанова Н. Н., Мельников В. Л. Бактериологический метод лабораторной диагностики : учеб. пособие / – Пенза : Изд-во ПГУ, 2015. С. 54.

12. Зверев В. В., Быков А. С. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология, 2017. С. 387-389.
13. Козлова Н. С., Баранцевич Н. Е., Баранцевич Е. П. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Klebsiella Pneumoniae* выделенных в многопрофильном стационаре. Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8. - № 1.- С. 79–84.
14. Кишкун А.А., Руководство по лабораторным методам диагностики - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. С. 445.
15. Коротяев А. И., Бабичев С. А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология : учебник для мед. вузов, 2017. С. 291.
16. Колотова А.А., Васильева О.Ю., Горошко П.В. Полимеразная цепная реакция как метод исследования в молекулярно-генетической диагностике, 2019. УДК 616–078:577.2. С. 48.
17. Лев А. И., Асташкин, О.И. Тазина, О.Н. Ершова, Н.В. Курдюмова, Н.Н. Карцев, Е.С. Леонова, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2016. – Т. 18. - №2 – Приложение 1. – С. 29.
18. Левинсон У., Пер. с англ. Медицинская микробиология и иммунология. Издательство "Лаборатория знаний", 2015. С. 120-122.
19. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С., Анкирская А.С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований, 2-е изд. 2017. С. 100-104.
20. Лопухов Л.В, Эйдельштейн М.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000; С. 96-105.
21. Меньшиков В.В. Методики клинических лабораторных исследований. Том III. Клиническая микробиология; 2009. С. 718.
22. Новиков, Д. К. Медицинская иммунология : учебное пособие для студентов медицинских вузов / Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Витебский государственный медицинский университет. - 3-е изд., перераб. и доп. - Витебск : [ВГМУ], 2002.

23. Нургалиева А.Х., Карунас А.С., Хусаинова Р.И., Хидиятова И.М., Ахметова В.Л., Валиев Русл.Р., Надыршина Д.Д., Мустафин Р.Н., Мурзабаева С.Ш., Хуснутдинова Э.К. Молекулярно-генетические методы изучения наследственных болезней человека: учеб. пособие – Уфа: РИЦ БашГУ, 2013: С. 38–58.
24. Николаева И.В., Анохин В.А., Хаертынов Х.С., Семенова Д.Р., Шайхиева Г.С. Нозокомиальная клебсиеллезная инфекция у новорожденных детей. Практическая медицина, 2016. С. 26-28.
24. Поздеев О.К. Медицинская микробиология. Издательство: ГЭОТАР-МЕД Год:2001. С. 371-373.
25. Патрушев Л.И., Мирошников А.И. - Искусственные генетические системы. Том 1. Генная и белковая инженерия, 2004.
26. Романовская Т. Р., Юркевич М. Ю. Инфекционная иммунология : лабораторный практикум – Минск : ИВЦ Минфина, 2017. С. 5-19.
27. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семёнов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. ПЦР «реального времени». 6-е изд. М.:БИНОМ. Лаборатория знаний; 2015.
28. Скриган Е. А. Полимеразная цепная реакция, 2019.
29. Сиволодский Е.П., Ровнов Н. П, Петров Л. Н. Механизм специфической хромогенной реакции *K. Spp.* на питательной среде с 5-амисолициловой кислотой.//Микробиология, 1994. №.3 С. 489-494.
30. Фесенко О. В., Швайко С. Н., Пневмонии, вызванные *Klebsiella pneumoniae* (фридлендеровские пневмонии). Практическая пульмонология, 2019. №1 С. 22-31.
31. Черкес Ф. К. Руководство к практическим занятиям по микробиологическим исследованиям: для фельдшер.-лаборант. отд-ний мед. уч-щ / - 2-е изд., перераб. и доп. - М. : Медицина, 1980.
32. Щербаков П.Л. Вопросы педиатрической гастроэнтерологии. РМЖ, Детская гастроэнтерология и нутрициология - 2003, Том 11 - № 3, 2003 г., С. 103-112.
33. Arya M., Shergill I. S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H.R. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Review of Molecular Diagnostics. 2005; 2: 209-219.

34. Avashia Nidhi, Garibyan Lilit, Polymerase Chain Reaction, 2013.
35. Ariadna Cruz-Cordova., Karina Espinosa-Mazariego, Verónica Esteban-Kenel, Sara A. Ochoa, Pathogenic determinants of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains associated with their persistence in the hospital environment, 2014.
36. Christopher A Broberg, Michelle Palacios, Virginia L Miller., *Klebsiella: A Long Way to Go Towards Understanding This Enigmatic Jet-Setter*, 2014 Aug:6:64.
37. David L. Paterson, M.D., Kris L. K. Siu, PhD, Feng Yee Chang, M.D. *Klebsiella species (K. pneumoniae, K. oxytoca, K. ozaenae and K. rhinoscleromatis)*: 2007.
38. Esposito EP, Cervoni M, Bernardo M, Crivaro V, Cuccurullo S., Imperi F., Zarrilli R., Molecular epidemiology and virulence profiles of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* blood isolates from the hospital agency «Ospedale dei Colli». Naples , Italy. *Frontiers in Microbiology* 2018;9:1463.
39. Encyclopaedia Britannica, Polymerase chain reaction, 2019.
40. E.NavarroG.Serrano-HerasaM.J.CastañoaJ.Solerab, Author links open overlay panel , 2014.
41. Hennequin, C. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae* / C. Hennequin, F. Robin // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2016. – Vol. 35. – No. 3. – P. 333-341.
42. Jan Walter , Sebastian Haller , Chantal Quinten , Tommi Kärki , Benedikt Zacher , Tim Eckmanns , Muna Abu Sin , Diamantis Plachouras , Pete Kinross , Carl Suetens , Ecdc Pps Study Group, Healthcare-associated Pneumonia in Acute Care Hospitals in European Union/European Economic Area Countries: An Analysis of Data From a Point Prevalence Survey, 2011 to 2012:2018.
43. John V. Ashurst; Adam Dawson. *Klebsiella Pneumonia*, 2020.
44. Karim Kadri. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications*, 2019.

45. Kralik P., Ricchi M. Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. Front Microbiol. 2017; 8: 108.
49. Li, B. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* / B. Li, Y. Zhao, C. Liu, Z. Chen, D. Zhou // Future Microbiol. – 2014. - №9. – P. 1071-1081.
46. Podschun R., Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors, Clinical Microbiology Reviews. 1998:589-603.
47. Paczosa M. K., Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense, 2016.
48. Petr Kralik, Matteo Ricchi, A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything, 2017.
49. Rebekah M. Martin and Michael A. Bachman, Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*, 2018.
50. Soza Tharwat Baban, Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Urinary Tract Infection, 2017.
51. Yuan J. S., Reed A., Chen F., Stewart C. N., Jr corresponding author. Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics. 2006; 7: 85-90.
52. <https://www.sciencesource.com>



АНТИПЛАГИАТ
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

Башкирский государственный
медицинский университет

СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Чуваткина Анна Кирилловна
Подразделение	Медико-профилактический факультет с отделением биологии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ
Тип работы	Выпускная квалификационная работа
Название работы	СОЗДАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО НАБОРА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ KLEBSITLLA PNEUMONIAE В КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ
Название файла	777ДИПЛОМ ЧУВАТКИНА.docx
Процент заимствования	20.22 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	8.85 %
Процент оригинальности	70.94 %
Дата проверки	08:01:31 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 общепотребительных выражений; Кольцо вузов
Работу проверил	Кобзева Наталья Рудольфовна ФИО проверяющего
Дата подписи	10.06.2020г.

Подпись проверяющего

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



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

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
Башкирский государственный
медицинский университет

ОТЗЫВ

Научного руководителя Баймиева Андрея Ханифовича
на выпускную квалификационную работу, на студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением биологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
Чуваткиной Анны Кирилловны

Дипломную работу студентка Чуваткина Анна Кирилловна проходила на базе БГМУ и ИБГ УНЦ РАН. За время практики она освоила современные молекулярно-генетические методы исследования: выделение ДНК с помощью различных наборов, полимеразная цепная реакция синтеза ДНК, электрофорез продуктов амплификации ДНК в полиакриламидном и агарозном гелях.

Чуваткина Анна Кирилловна проводила исследования по созданию диагностического набора с целью количественного определения бактерий *Klebsiella pneumoniae* в клинических образцах. В результате проведенной работы была создана тест система для обнаружения возбудителя и определения количественного содержания в исследуемом образце.

За период работы в лаборатории проявила себя как целеустремленный студент, способный выполнить поставленную руководителем экспериментальную работу. Чуваткина А. К. отличается большим трудолюбием и настойчивостью в работе.

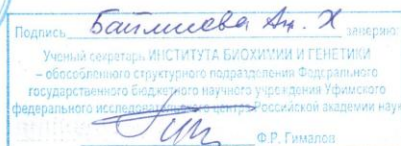
Научный руководитель:

д.б.н., профессор

кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии



Баймиев Ан.Х.



РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением биологии ФГБОУ ВО
БГМУ Минздрава России

Чуваткиной Анна Кирилловны

Дипломная работа Чуваткиной Анны Кирилловны посвящена созданию тест-системы с возможностью выявления и количественного определения возбудителя в клиническом образце. Объектом исследования в данной работе являлась бактерия *Klebsiella pneumoniae*.

Работа построена по традиционной схеме, включает введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследований, представление собственных данных и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы.

В ходе исследования использовались современные молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики. В главе – результаты исследования, полно изложены основные итоги проделанной работы.

Дипломная работа Чуваткиной А.К. удовлетворяет всем предъявляемым требованиям дипломной работы, может быть допущена к защите.

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

Баймиев Ал.Х.



РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением биологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
Чуваткиной Анны Кирилловны

Выпускная квалификационная работа на тему: **«Создание
диагностического набора для количественного определения бактерий
Klebsiella pneumoniae в клинических образцах»**

Работа построена по традиционному плану: состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы, хорошо проиллюстрирована рисунками.

Целью работы являлось создание тест-системы с возможностью выявления и количественного определения концентрации возбудителя в клиническом образце.

Текстовая и графическая выпускной квалификационной работы была выполнена непосредственно с использованием пакета прикладных программ.

Выпускная квалификационная работа считается завершенной, и может быть рекомендована к защите с оценкой «отлично».

канд.биол.наук, доцент
кафедры специальной химической технологии
ФГБОУ ВО «УГНТУ»

З.Р. Бикмурзина