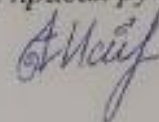


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи



Шайдуллина Алия Дамировна

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АТИПИЧНЫХ
Mycobacterium spp. В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ.

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор



А.Р.Мавзиотов

Научный консультант:

Уфа – 2020

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Характеристика бактерий рода <i>Mycobacterium</i>	8
1.2. Нетуберкулезные микобактерии	11
1.3. Микобактериозы	14
1.4. Распространенность микобактериозов	19
1.5. Рентгенографические исследования	23
1.6. Иммунологическая диагностика	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	27
2.1. Взятие биоматериала	27
2.2. Микроскопическое исследование	29
2.3. Культуральный метод	30
2.4. Технология MALDI-ToF MS	31
2.5. Выделение ДНК	31
2.6. Пан-микобактериальный 16S ген рРНК ПЦР	32
2.7. Широкоспектральная микобактериальная ПЦР	33
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	35
3.1. Анализ микроскопического исследования	35
3.2. Анализ культурального метода	35
3.3. Анализ технологии MALDI-ToF MS	36
3.4. Анализ молекулярно-генетической идентификации НТМ	37
3.5. Сравнительная характеристика методов идентификации микобактерий	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	39
ВЫВОДЫ	40

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	41
------------------------	----

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ЛПС – липополисахарид

НТМ – нетуберкулезные микобактерии

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Нетуберкулезные микобактерии (НТМ) появляются во всем мире как значимые причины хронической легочной инфекции, создавая ряд проблем как для клиницистов, так и для исследователей. Хотя в ряде исследований, проведенных во всем мире, со временем отмечается рост распространенности НТМ-легочной патологии, популяционные данные являются относительно скудными и подвержены систематическому искажению.

Нетуберкулезные микобактерии, в отличие от сложных видов микобактерий туберкулезного комплекса, являются бактериями, широко распространенными в окружающей среде, и могут быть обнаружены в водах водоемов, почв, водопроводов, пище, а также в больничных учреждениях (Phillely JV, Griffith DE 2019). НТМ являются большой группой условно-патогенных микроорганизмов, которые при условии сниженной иммунологической реакции могут вызывать тяжелые заболевания, что указывает на большую значимость идентификации бактерий (Prevos R., Marras T.K., 2015, Оттен Т.Ф., 1999). Патогенные НТМ нередко становятся причиной легочной инфекции (90% случаев), в тоже время внелегочные проявления могут поражать всевозможные ткани и органы, вызывая, лимфаденит, инфекции кожи, костей или мягких тканей, или могут быть рассеяны (Griffith D.E., T. Aksamit, B.A. Brown-Elliott, 2017, Kasperbauer S, Huitt G, 2013).

Так как микобактериозы имеют схожую клиническую картину с туберкулезом. Из-за этой болезни, вызванные НТМ принимаются за различные формы туберкулезного поражения дыхательной системы человека. Еще одной причиной затруднения в определении возбудителя, является большое разнообразие видов, которые могут приводить к сходным заболеваниям, но при этом требуют различные методы лечения, что делает микробиологическую диагностику важной (Falkinham JO 3rd, 2013, Mazza-Stalder J, Jatton-Ogay K, Nicod L, 2009, Phillely JV, Griffith DE 2019). Благодаря

структурным особенностям, микобактерии устойчивы ко многим антибиотикам, поэтому требуется длительное лечение комбинацией нескольких антимикробных молекул, выбор которых основан на видовой идентификации и результатах тестирования чувствительности к антибиотикам (Philly JV, Griffith DE, 2019).

В 1960 году был разработан метод идентификации нетуберкулезных микобактерий, который основывался на определении формы и цвета колоний на плотной среде и биохимических свойствах микроорганизмов. Процесс культивирования микобактерий требует специальные среды и температуры. Мазок-исследование клинических образцов для выявления кислотоустойчивых бацилл исторически первый микробиологический тест для диагностики микобактериальной инфекции. Но, метод обладает ограниченной чувствительностью и специфичностью, а также не дает возможность определить вид. В частности, микроскопия мазка не позволяет отличить микобактерии туберкулеза от НТМ (Opota O, Senn L, Prod'hom G, Mazza-Stalder J, Tissot F, Greub G et al, 2016).

Учитывая важную этиологическую роль условно-патогенных нетуберкулезных микобактерий, неспецифические клинические проявления указывают на необходимость находжений новых методов идентификации микобактерий и в разработки тест-систем.

Цель работы. Разработка способа молекулярно-генетической детекции основных клинически значимых представителей атипичных *Mycobacterium spp.*

Задачи исследования:

1. Анализ литературных данных и формирование реестра видов атипичных *Mycobacterium spp.*, имеющих наибольшее значение для РФ.
2. Подбор оптимальных методов выделения ДНК и мишеней, применимых для молекулярно-генетической детекции атипичных *Mycobacterium spp.*

3. Оценка информативности молекулярно-генетической детекции атипичных *Mycobacterium spp.* в исследуемых образцах.

4. Анализ полученных литературных данных, сравнительная оценка частоты встречаемости отдельных видов атипичных *Mycobacterium spp.* в клинических образцах и ретроспективная характеристика эпидемиологических особенностей, связанных с ними заболеваний.

Научная новизна и теоретическая ценность работы. Новизна исследования заключается в изучении новых высокоспецифичных и чувствительных методов выделения и идентификации НТМ.

Научно-практическая значимость. Работа представляет научно-практический интерес, заключающийся в сравнительном изучении методов определения НТМ для последующей постановки правильного и точного диагноза.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика бактерий рода *Mycobacterium*

Бактерии этого рода имеют вид прямых или слегка изогнутых палочек длиной 1-10 мкм, диаметром 0,2-0,6 мкм. В процессе развития могут принимать кокковидную форму. В период интенсивного роста и размножения клеток, они образуют нитевидные структуры. Способность к ветвлению зависит от вида бактерий, возраста культуры и состава питательной среды.

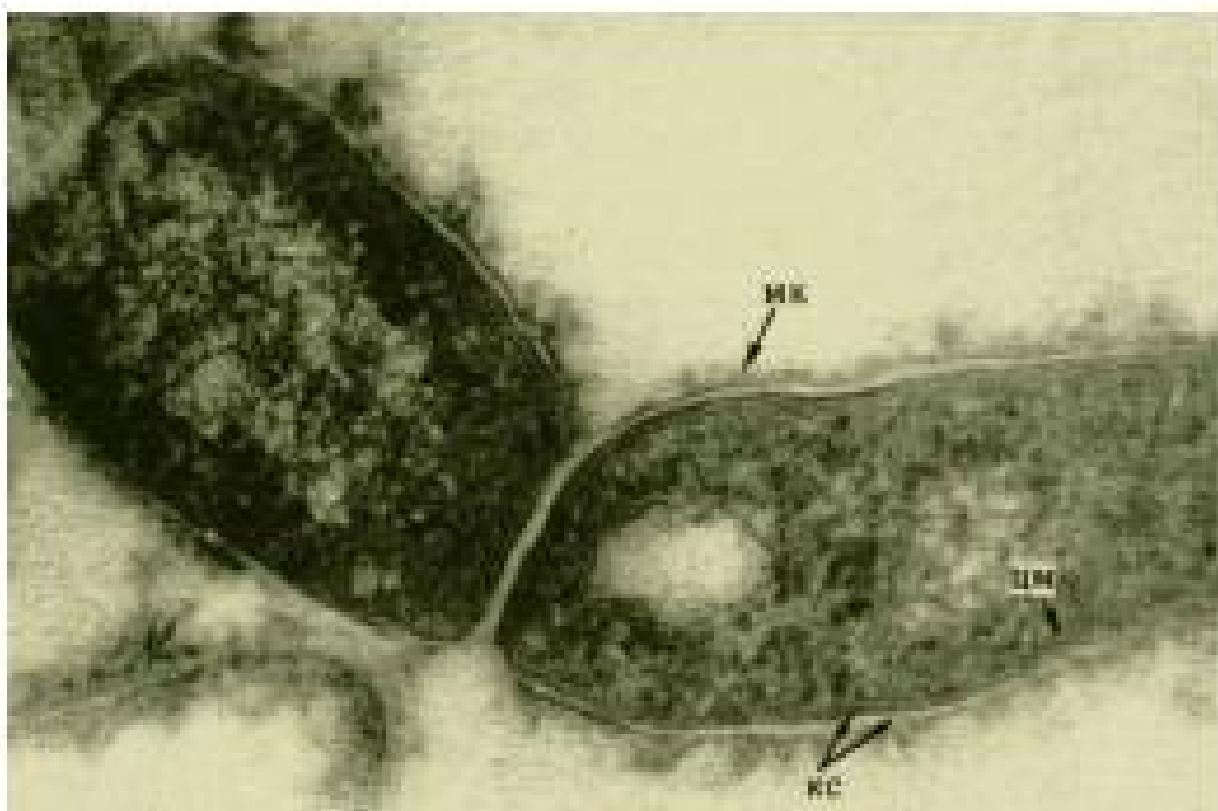


Рисунок 1 - Электронная микрофотография *M. tuberculosis*. МК – микрокапсула; КС - клеточная стенка; ЦМ - цитоплазматическая мембрана (Литусов Н.В., 2015)

Микобактерии неподвижны, спор не образуют, имеют микрокапсулу, которая состоит из гликопептидов. Отличительным признаком от бактерий других таксономических групп является клеточная оболочка. В составе клеточной стенки микобактерий присутствуют специфические соединения:

внешние липиды, миколовые кислоты, липоарабиноманнан, маннозиды, полисахариды и пептидогликан.

Пептидогликан представляет собой первичный каркас клеточной стенки. Снаружи от пептидогликана располагается слой полисахаридов, представленными арабиногалактанами. Полисахаридный слой изнутри связан с пептидогликаном, а снаружи с миколовыми кислотами. Миколовые кислоты представлены свободными сульфолипидами, микозидами или гликолипидами. Слой внешних липидов называют микозидами, определяющими антигенные свойства микобактерий. Липоарабиноманнан закреплен на цитоплазматической мембране, пронизывает клеточную стенку и выходит на поверхность микробной клетки терминальными фрагментами (Griffith, D.E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B.A., Catanzaro, 2017). Высокое содержание липидов определяет щелочеустойчивость, кислотоустойчивость и спиртоустойчивость микобактерий, затрудняет окрашивание обычными методами, обуславливает вирулентность и длительную сохраняемость микобактерий в окружающей среде. Основным детерминантом экологии и эпидемиологии НТМ является наличие богатой липидами наружной мембраны (Hoffman et al., 2008). Длинноцепочечные миколовые кислоты внешней мембраны способствуют гидрофобности, непроницаемости и медленному росту как медленно, так и быстро растущих микобактерий (Brennan and Nikaido, 1995). Эти особенности, в свою очередь, приводят к преимущественному прикреплению к поверхностям (Bendinger et al., 1993) и устойчивость к дезинфицирующим средствам и антибиотикам (Jarlier, V. and Nikaido, 1994).

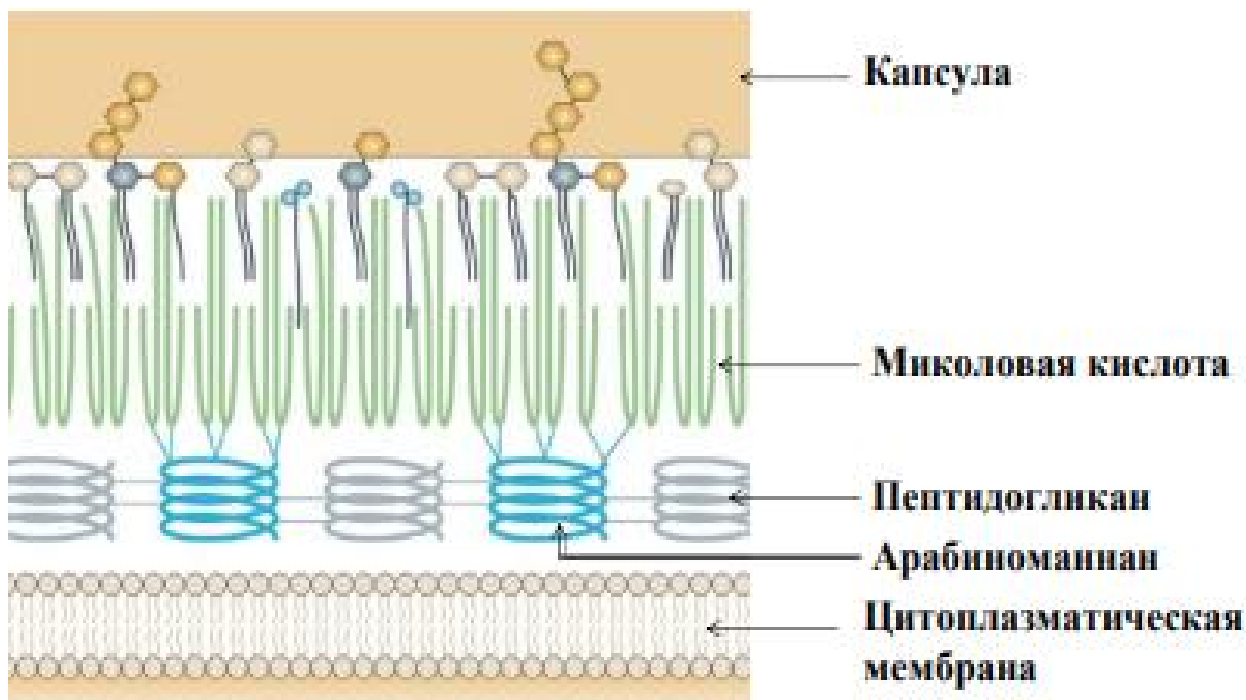


Рисунок 2 – Схематическое расположение капсулы и компонентов клеточной стенки микобактерий (Литусов Н.В., 2015)

Микобактерии являются грамположительными микроорганизмами, но при окраске по Граму не прокрашиваются кристаллвиолетом. К группе грамположительных бактерий они относятся в связи с отсутствием внешней клеточной мембраны. Оптимальная температура роста 37- 38°C. Растут медленно из-за наличия в клеточной стенке липидов, замедляющих обмен веществ с окружающей средой (Dolgova V.V., 2013).

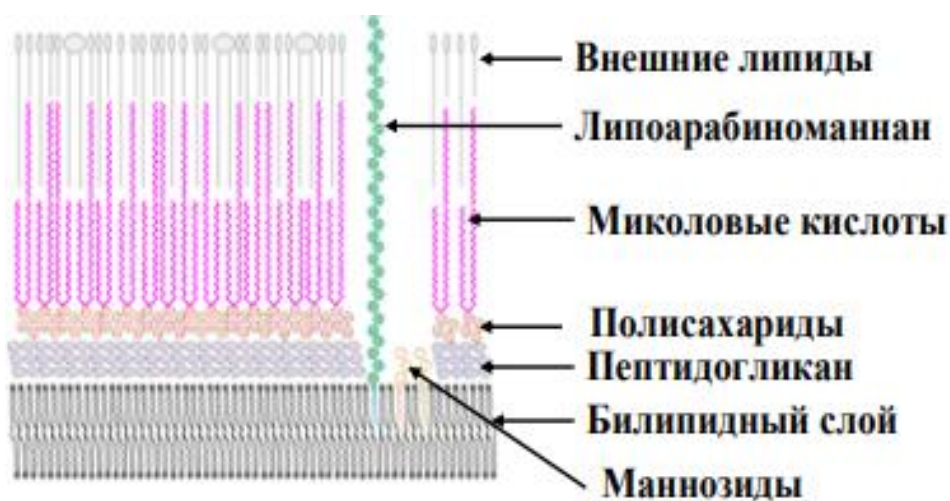


Рисунок 3 – Схематическое строение клеточной стенки микобактерий (Литусов Н.В., 2015)

Принадлежащие к единственному роду в семействе *Mycobacteriaceae* является разнообразной группой бактерий, которые широко различаются по нескольким признакам, таким как их патогенный потенциал у человека и животных, резервуары и динамика роста в культуре. По большей части микобактерии можно разделить на четыре основные группы: основанные на фундаментальных различиях в эпидемиологии, ассоциации с заболеванием и способности расти, которые относятся к комплексу *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* и *Mycobacterium ulcerans*, к нетуберкулезным микобактериям (Betty A. Forbes, Geraldine S и др. 2017).

1.2. Нетуберкулезные микобактерии

Термин «нетуберкулезные микобактерии» характеризует разнообразную группу свободно живущих и условно-патогенных микобактерий, которую требуется отделять от возбудителей туберкулеза.

По скорости роста нетуберкулезные микобактерии можно разделить на 2 группы, на медленно растущие НТМ и быстро растущие НТМ.

Медленно растущие нетуберкулезные микобактерии часто становятся причиной заболеваний человека. НТМ может привести к колонизации, инфекции или заболеванию (Brown-Elliott BA, Nash KA и др., 2012). Колонизация и инфекция могут быть преходящими, прерывистыми или длительными. Поскольку люди находятся в постоянном контакте с НТМ в окружающей среде, НТМ можно обнаружить в дыхательных и желудочно-кишечных трактах или на коже здоровых людей.

M. avium и *M. intracellulare* микобактерии с гладкими, плоскими и прозрачными колониями. Мак является одним из НТМ, который наиболее часто идентифицируется как патоген в респираторных образцах. Исторически сложилось, что ПДК включает два вида-*M. avium* и *M. intracellulare* (Adjemian J, Prevots DR и др., 2014).

Mycobacterium kansasii – медленно растущая фотохромогенная бактерия. Расположен на втором месте как возбудитель микобактериозов (Cook JL., 2010). Выделение *M. kansasii* в образцах человека часто свидетельствует о болезни. Основным резервуаром бактерий является водопроводная вода. Первичное проявление *M. kansasii* инфекция напоминает туберкулез легких, с полостными инфильтратами в верхних долях, но есть сведения о узловато-бронхоэктатическое заболевание легких (Brown-Elliott BA, Nash KA и др., 2012).

Mycobacterium xenopi – медленно растущая термофильная микобактерия с оптимальной температурой для роста от 42°C до 45°C, была впервые выделена из кожных поражений, африканской жабы. Бактерия находится в системах горячего водоснабжения, особенно в больницах, что также может привести к внутрибольничным инфекциям или загрязнить клинические образцы. (Griffith DE, Aksamit T и др., 2007).

Mycobacterium malmoense – микроорганизмы, которые выделяют из мокроты или шейных лимфатических узлов детей или взрослых с сопутствующими хроническими заболеваниями легких, часто с вовлечением полостных органов. На данный момент времени большинство случаев заражения *M. malmoense* было зарегистрировано в Северной Европы и Японии. (Brown-Elliott BA, Nash KA, 2012).

Mycobacterium haemophilum – это безглия микобактерия с оптимальной температурой роста от 28 ° C до 30°C, которая лучше растет на твердой среде и требует гемина или гемоглобина в качестве источника железа. Из-за этих особых условий роста этот организм часто недооценивается. Температурные предпочтения согласуются с тем, что *M. haemophilum* обычно заражает более прохладные участки тела, такие как конечности. (Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ, Jr. 2012).

Mycobacterium marinum – это фотохромогенные микроорганизмы, который растут при температурах от 30°C до 33 ° C. *M. marinum* является

возбудителем, который обитает в пресноводной или соленой воде (Griffith DE, Aksamit T и др., 2007).

Mycobacterium szulgai – медленно растущая микобактерия, которая является скотохромогенной при 37°C и фотохромогенной при 25°C. Идентификация *M. szulgai* из окружающей среды осуществляется редко. Клиническая картина легочных инфекций у *M. szulgai* неотличим от туберкулеза и обычно развивается у мужчин среднего возраста со злоупотреблением курением и алкоголем (Kent PT, Kubica GP, 1985).

Быстрорастущие НТМ очень часто выделяются в клинических лабораториях и могут быть причиной значительных местных и диссеминированных заболеваний. Обзор всех быстро растущих микобактерий выходит за рамки настоящего документа; здесь кратко обсуждаются только те из них, которые наиболее часто вовлечены в инфекцию человека.

Mycobacterium abscessus – нехромогенные микобактерия, которые возможно выделена из источников окружающей среды. Этот вид является наиболее патогенным среди быстрорастущих микобактерий. Обитают в воде, почве и пыли, и отвечают за широкий спектр инфекций. У человека вызывает легочные инфекции и инфекции кожи, мягких тканей и костей (Kim BJ, Math RK, 2013)

Mycobacterium chelonae – нехромогенные, быстрорастущая микобактерии, которая обитают в водопроводе, морях и пресноводных водах. Чаще всего поражает кожу и мягкие ткани, причиной является с прокалывающими ранами, загрязнением чернилами татуировки, пластической хирургией и липосакцией (Okano Y, Shinohara T и др., 2016).

Условно-патогенные нетуберкулезные микобактерии являются возбудителями микобактериозов.

1.3. Микобактериозы

Большинство видов, нетуберкулезных микобактерий отличаются от микобактерий туберкулезного комплекса тем, что они не являются облигатными патогенами, а являются обитателями окружающей среды. В отличие от туберкулеза, вызванного *M. tuberculosis*, который распространяется от человека—человека или человека—животного или наоборот, нетуберкулезные микобактериальные инфекции не считаются особенно заразными (Brown, 1985). Существует мало или вообще нет доказательств того, что инфекция может передаваться от одного человека к другому. В нескольких докладах обсуждалась возможность совместного инфицирования как *M. tuberculosis*, так и НТМ у отдельных лиц (Shamaei et al., 2010). Тем не менее нельзя игнорировать роль НТМ, особенно когда речь заходит о проблемах общественного здравоохранения, несмотря на то, что пока не предлагается никакого окончательного пути передачи инфекции. НТМ и патологии, которые они вызывают, получили все большее внимание во всем мире в течение последнего десятилетия (Griffith et al., 2007) несмотря на то, что число зарегистрированных случаев заболевания по-прежнему относительно невелико.

Механизм передачи микобактериозов не изучен полностью. На данный момент времени, изученными входными воротами для НТМБ являются дыхательные пути, кожные покровы, желудочно-кишечный тракт. По существующим данным, выделяют три основных механизма передачи: фекально-оральный, аэрогенный и контактный (Primm T.P., Lucero C., Falkinham J.O., 2004).

Аэрогенный механизм передачи осуществляется во время вдыхания аэрозолей, в которых находятся микобактерии. Так как есть данные, которые указывают присутствие НТМ в открытых водоемах, в водопроводной воде, то можно предположить, места формирования таких аэрозолей будут находиться в близости от водного объекта, а также при

технологическом использовании такой воды. (Conger N.G., O'Connell R.J., Laurel V.L., Olivier K.N., Graviss E.A., Williams-Bouyer N., 2004).

НТМ были выделены из внешней среды медицинских организаций, нельзя отрицать возможность заражения микобактериозом при использовании дыхательной и наркозной аппаратуры.

При фекально-оральном механизме заражения поражается желудочно-кишечный тракт человека при употреблении воды или пищи, загрязненными микобактериями. Этому способствует свойство бактерий, которое сохраняет его в кислой среде желудка (McGarvey J., Bermudes L., 2001).

Контактный механизм передачи происходит в результате контактного взаимодействия человека и объекта, который содержит НТМ, поврежденные кожные покровы не могут остановить заражение. Контактный механизм передачи распространен при уходе за инфицированными животными, работе с почвой без защиты и купании, без последующего заглатывания воды, содержащей НТМБ (Прокопьева Н.И., Протоdjаконова Г.П., Павлов Н.Г. 2011).

Гидрофобность поверхности клеток является главным определяющим фактором наличия НТМ в системах распределения питьевой воды и бытовой сантехники. Количество *Mycobacterium avium* в системах горячего водоснабжения больниц было увеличено относительно поступающей воды (Du Moulin *et al.* 1988). При исследовании бытовой сантехники больницы были восстановлены изоляты *M. avium*, которые связаны с изолятом пациента (Falkinham *et al.* 2008). Те же самые факторы, влияющие на количество и распределение НТМ в системе распределения питьевой воды, вероятно, действуют и в бытовой сантехнике. Существует вероятность, что как быстро, так и медленно растущие НТМ могут выживать в нагревателях горячей воды и трубах горячей воды, поскольку они выдерживают температуру между 50 и 55°C (Schulze-Röbbecke and Buchholtz

1992 ; Santos *et al.* 2007). Если температура нагревателя горячей воды не поддерживается выше 50°C, НТМ может распространяться в домашних горячих водах. Низкие концентрации кислорода в результате уменьшения или прерывистого течения воды в домашних хозяйствах и потребления кислорода микробами не могут ограничивать рост НТМ. *Mycobacterium smegmatis* может адаптироваться к выживанию при низких концентрациях кислорода (Dick *et al.* 1998) и штаммы *M. avium* и *M. intracellulare* может расти на 6-12% кислорода (Льюис и Фолкнем, неопубликованные). Таким образом, бытовая сантехника обеспечивает стабильную, ограниченную питательными веществами, дезинфицирующую среду обитания, которая идеально подходит для роста и сохранения НТМ.

В научных работах были зафиксированы заражения микобактериями при трансплантациях и хирургической биопсии. (Оттен Т.Ф., 2014).

Люди ВИЧ-инфицированные более подверженные к микобактериозам (Альварес Фигерра М.В., Леви Д.Т, 2014). У больных рентгенологическая картина часто нормальная или может выявить фиброз, кавитацию верхней доли, узловую или паренхиматозную помутнение и утолщение плевры. Наиболее частыми симптомами являются кашель, повышение температуры тела. Пациенты преимущественно сильно иммунокомпрометированы и имеют количество лимфоцитов CD4 ниже 100/мкл. В последние годы широкое применение высокоактивных антиретровирусных методов лечения, включающих эффективные средства профилактики крайнего истощения лимфоцитов, позволило резко снизить частоту микобактериальных легочных заболеваний у ВИЧ-позитивных пациентов. Работы автора показывают, что наиболее часто НТМБ, ответственные за заболевание, относятся к комплексу *Mycobacterium avium* (MAC) (С.В. Inderlied, С.А. Kemper, 1993). Установить реальный масштаб проблемы на данный момент невозможно, так как инфекция не специфична, а в больницах не проводится полное бактериологическое обследование (Rossi M., Flepp M. и др., 2001).

Также большой группой риска по заболеванию микобактериозами, вызванными НТМ, являются больные туберкулезом и лица, которые перенесли данное заболевание (Старкова Д.А., 2013). НТМ и возбудитель туберкулеза могут вызывать микстинфекцию, так и моноинфекцию, которые трудно дифференцировать в практике методами диагностики в медицинских учреждениях. Исследования, проведенные с использованием более чувствительных методов, позволили описать видовой состав НТМБ, выделенных от пациентов медицинских учреждений г. Москвы. В итоге исследования были выделены микроорганизмы *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. xenopi* и *M. fortuitum* (Волгина Е.Г., 2014).

В научном труде было проведено исследование, которое показало, что 71% (48/68) пациентов имели единственную положительную культуру для НТМ во время противотуберкулезного лечения, и только 13% (9/68) имели повторные положительные культуры для НТМ после завершения противотуберкулезного лечения. Кроме того, только у двух (3%) пациентов после противотуберкулезного лечения были получены два и более положительных культуральных результата с одинаковыми видами НТМБ (S. Park, G.Y. Suh, M.P. Chung, 2008).

Учитывая эти данные можно сказать, что положительные культуры из дыхательных путей человека могут указывать на инфекцию, колонизацию или загрязнение образцов.

Кроме того, для диагностики НТМ легочной патологии нужно исключить другие нарушения, таких как туберкулез (D. E. Griffith, T. Aksamit, B. A. Brown-Elliott, et al., 2007). На данный момент времени значение НТМ, которые были выделены от пациента с туберкулезом легких, является неопределенным. К тому же были зарегистрированы случаи микобактериоза после трансплантации почки или сердца, а позже случаи локального воспаления подкожной клетчатки,

подкожных абсцессов и остеомиелита микобактериальной этиологии, развившиеся после проникающих ранений (Волгина Е.Г., 2014).

Таким образом, была выделена еще одна группа риска по заболеванию микобактериозом. Это лица преклонного возраста, больные лейкемией, пациенты, которым нужно постоянно принимать кортикостероиды, иммунодепрессанты и антибиотики (Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Корниенко М.Н., 2009).

Заболевание поражает преимущественно пожилых мужчин с рестриктивными или обструктивными легочными состояниями и представляет собой клиническую картину, которая схожа с хронической пневмонией (S.J. Fowler, J. French и др., 2006).

К профессиональным заболеваниям легких (пневмокониозам и силикозам) приводят также работа в условиях вредного производства высокая запыленность рабочей пространства (Старкова Д.А., 2013).

Выделение различных видов быстрорастущих микобактерий из аэрозолей, производимых на фабриках, привело к теории, что микобактерии, по всей видимости, могут быть ответственны за гиперчувствительность (Environ Health Perspect, 2005).

Интересно отметить, что увеличение доли легочных заболеваний, вызванных НТМ, по-видимому, связано с одновременным снижением заболеваемости туберкулезом. Однако, получение точной картины эпидемиологии заболеваемости НТМ осложняется тем, что эти инфекции не регистрируются в большинстве стран мира. Таким образом, в результате дозорного эпиднадзора и лабораторных микробиологических исследований с сопутствующими ограничениями этих исследовательских проектов получена большая часть имеющихся эпидемиологических данных о легочной НТМ. Кроме того, описание эпидемиологии НТМ легочной патологии осложняется несколькими проблемами: установление случая заболевания (например, пациенты имеют переменную

симптоматику, и диагноз часто зависит от компьютерной томографии, наличие организма в окружающей среде, которое затуманивает значимость позитивной культуры у отдельного пациента, определение заболевания, основанное на скудных доказательствах, отчетность о заболевании не требуется или не выполняется во многих юрисдикциях, что приводит к пятнистым популяционным данным.

Вызывают тяжелые заболевания нетуберкулезные микобактерий, которые распространены в окружающей среде, что служит показанием на большую значимость НТМ как инфекционного агента, и требует тщательных исследований.

1.4. Распространенность микобактериозов

В Российской Федерации не ведется официальная статистика заболеваний, которые вызвали НТМ, и нет методических рекомендации идентификации и лечения больных. Поэтому невозможно провести динамику, а также территориальную распространенность микобактериозов на данный момент времени (Старкова Д.А., 2013).

В Онтарио, Канада, ежегодная Распространенность выделения НТМ из респираторных образцов (без учета наличия истинного заболевания) в последнее время колебалась от 14,1 до 22,2 на 100 000 населения (K.L. Winthrop, E. McNelley, B. Kendall, A. MarshallOlson, C. Morris, M. Cassidy, *et al.* 2010). В одном исследовании распространенность заболевания оценивалась как 9,8 на 100 000 в 2010 году. За исключением *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium avium complex* (MAC) оказался наиболее распространенным видом, как выделенным из дыхательных путей, так и связанным с клинической инфекцией легких, за которым следуют *Mycobacterium xenopi* и быстрорастущие микобактерии. (Т.К. Marras, D. Mendelson 2013).

В штате Орегон, США, расчетная Распространенность легочной НТМ-болезни составила 8,6 на 100 000 человек. (K.L. Winthrop, E. McNelley, B. Kendall, A. Marshall-Olson, C. Morris, M. Cassidy 2010). Популяционное исследование в том же штате выявило рост заболеваемости НТМ легких с 4,8 на 100 000 в 2007 году до 5,6 на 100 000 в 2012 году. (E. Henkle, K. Hedberg, S. Schafer, S. Novosad, K.L. Winthrop 2015). В других частях страны с использованием лабораторного наблюдения, дополненного электронным анализом медицинской документации в рамках четырех систем здравоохранения, Распространенность легочных заболеваний, вызванных НТМ, по оценкам, составляет 1,4-6,6 на 100 000 населения. (D.R. Prevots, P.A. Shaw, D. Strickland, L.A. Jackson, M.A. Raebel, M.A. Blos, 2010) В 2007 году, используя данные МКБ-9 кодирование (Международная классификация болезней 9-го пересмотра), распространенность заболевания приблизительно 47 на 100 000 наблюдалась среди взрослых в возрасте ≥ 65 лет в США, хотя наблюдалась довольно выраженная дисперсия в региональной распространенности НТМ легочной патологии в разных частях страны (J. Adjemian, K.N. Olivier и др. 2012).

Доступная информация из Центральной и Южной Америки была ограничена, что может привести к существенной предвзятости отбора, что ставит под сомнение совокупность данных.

По имеющимся данным, предполагаемая распространенность заболевания легких НТМ составляет около 1 случая на 100 000 или даже меньше. Мак был, как правило, наиболее распространенным видом, выделенным после *Mycobacterium kansasii* и RGM (K.G. de Mello, F.C. Mello 2013).

В Европе, в связи с различными методологиями исследования и различиями в изучаемых базовых популяциях, данные о распространенности выделения НТМ из респираторных образцов и о распространенности такого заболевания были противоречивыми.

Например, в Великобритании, Греции и Нидерландах были обнаружены показатели изоляции НТМ примерно в 2,9 на 100 000, 7,0 на 100 000 и 6,3 на 100 000 соответственно, а распространенность легочного заболевания НТМ, по оценкам, составляет 1,7 на 100 000, 0,7 на 100 000 и 1,4 на 100 000 соответственно. Для этого континента последние данные также выявили заметную географическую изменчивость у видов, изолированных от пациентов. ПДК были изолированы чаще в Северной Европе (44% среди всех НТМ), чем в Южной Европе (31% от всех НТМ), причем *M. avium* был преобладающим подвидом *M. xenopi* чаще изолировали в Южной Европе (21% от всех изолятов НТМ), чем в Северной Европе (только 6%) (Hoefsloot, J. van Ingen и др., 2013).

В Африке в последнее время наблюдается энтузиазм в отношении поиска НТМ у пациентов с подозрением на туберкулез легких. Хотя в этих исследованиях не было категорически классифицировано заболевание легких НТМ, их результаты свидетельствуют о том, что у части пациентов с подозрением на туберкулез (3,7–15%) на самом деле может быть заболевание НТМ, а не туберкулез. Аналогичным образом, другие исследования показали, что значительная доля пациентов с подозрением на туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (18% в каждом из двух исследований) может иметь НТМ-легочную болезнь вместо этого (M. Maiga, S. Siddiqui, и др., 2012).

В Азии не было проведено популяционного исследования эпидемиологии НТМ-легочных изолятов и НТМ-легочных заболеваний, позволяющего глубоко понять масштабы этой проблемы. Имеются данные, полученные в результате исследований, проведенных в некоторых странах и географических районах Восточной Азии, в частности в Японии, Южной Корее, Индии, Китае, Таиланде и Тайване (S. Simons, J. van Ingen, и др., 2011). Исследование, проведенное в Японии, показало, что в 2005 году национальная Распространенность НТМ-болезни легких составляла от 33 до 65 случаев на 100 000 населения. (K. Morimoto, K. Iwai, K. Uchimura, M.

Okumura, T. Yoshiyama, K. Yoshimori, 2014). Ведущая роль ПДК в легочных изолятах НТМ была также отмечена в большинстве других стран Восточной Азии (S. Simons, J. van Ingen и др., 2011) к другим часто изолируемым видам относятся RGM и *M. kansasii*. *Mycobacterium scrofulaceum* и *Mycobacterium szulgai* также иногда встречались в респираторных образцах. Согласно результатам исследования, проведенного на Тайване, в 2008 году предполагаемая распространенность заболевания составила 7,94 на 100 000 стационарных больных, причем это заболевание в основном встречается у пожилых людей (C.C. Lai, C.K. Tan, и др., 2010).

В некоторых азиатских странах, где основным методом диагностики туберкулеза является кислотно-быстрый метод, кроме того, существуют опасения, что ряд пациентов с диагнозом туберкулеза, особенно предполагаемого лекарственно-устойчивого туберкулеза, могут на самом деле иметь НТМ легочной патологии 30,7% изолятов, которые тестировали резистентность к изониазиду и рифампицину и 4% случаев туберкулеза отступления в одном исследовании из Китая, аналогично африканским данным (H. Jing, H. Wang и др., 2012). Исследование из Китая показало, что в 3,4% мазков-положительных образцов мокроты растет NTM, в первую очередь MAC (Y. Shao, C. Chen, 2015).

В Австралии и Новой Зеландии было проведено несколько надежных популяционных исследований для изучения эпидемиологии изоляции и заболеваний НТМ легких. Самые последние данные свидетельствуют о росте заболеваемости/распространенности (часто бывает сложно отличить одно от другого), которая достигла 3 случаев на 100 000 человек. МАК последовательно является наиболее часто выделяемым видом НТМ легких, ассоциированным с легочным заболеванием (R.M. Thomson, 2010).

Таким образом, имеющиеся данные, особенно полученные в результате популяционных исследований, проведенных в странах Северной Америки, Европы и Австралии, свидетельствуют о продолжающемся росте

распространенности легочных изолятов НТМ и НТМ-заболеваний на этих континентах. Исследования, проведенные в некоторых странах и географических районах Восточной Азии, таких как Япония, Южная Корея и Тайвань, подтвердили это явление (D.R. Prevots, T.K. Marras, 2015).

НТМ-это вездесущие организмы, встречающиеся в экологических источниках, которые включают питьевую и природную воду, а также почву и пыль. Люди могут вдыхать или поглощать НТМ в воде, аэрозолях или пыли. НТМ достаточно устойчивы к воздействию водных дезинфицирующих средств общего назначения, таких как хлор (M. Thomson, 2013).

Диагностика микобактериозов сложна из-за отсутствия характерной клинической картины. Клинические симптомы микобактериозов органов дыхания обычно неотличимы от туберкулеза. Отсутствуют также характерные рентгенологические и гистоморфологические признаки заболевания. Диагностика НТМ легочной патологии часто задерживается, поскольку симптомы носят неспецифический характер и часто встречаются в легочной патологии (E.P. Szymanski, J.M. Leung, 2015). Кроме того, пациенты с рентгенологически минимальным заболеванием (например, солитарные или несколько узелков) могут быть полностью бессимптомными, а бронхоэктаз или узелки, которые приводят к диагностике НТМ, могут быть обнаружены только случайно с помощью визуализирующих исследований, выполненных с другой целью (J.B. Alpert, J.P. Fantauzzi, K. Melamud, H. Greenwood, D.P. Naidich, J.P. Ko, 2012).

1.5. Рентгенографические исследования

Рентгенологическое исследование диагностический инструмент при поражении вызванных микроорганизмами семейства *Mycobacteriaceae*. Типичные рентгенографические данные включают спектр от солитарного узелка до множественных узелков с бронхоэктазией и обширным фиброзно-кавитационным заболеванием. Предпочтительным рентгенологическим

исследованием для оценки предполагаемого НТМБ легочного заболевания является компьютерная томография (КТ) высокого разрешения, хотя последние данные свидетельствуют о том, что позитронно-эмиссионная томография (ПЕТ) или грудная магнитно-резонансная томография (МРТ) являются новыми условиями, которые могут стать полезны в будущем (J.H. Chung, G. Huitt, 2016). Обнаружение узелков, ассоциированных с областями бронхоэктаза, что могло привести к мысли о НТМ легочной патологии, но только от 33% до 54% являлось положительными (W.J. Koh, K.S. Lee, 2005). Кроме того, узелки, связанные с бронхоэктазией, гораздо чаще ассоциируются с НТМ легочной болезнью, чем туберкулез (S.L. Primack, P.M. Logan, 1995). Основываясь на эти исследования можно предположить, что этот метод возможно полезен при сортировке дифференциального диагноза, пока микробиологическое подтверждение будет не готово. Обширные бронхоэктазы и бронхоэктазы с вовлечением правой средней доли и язычка тоже благоприятствуют НТМ легочной болезни по сравнению с туберкулезом (D.A. Lynch, P.M. Simone, 1995). Помимо узелков и бронхоэктазов наличие полости на КТ по аналогии свидетельствует о НТМ легочной патологии (T.K. Marras, U. Wagnetz, F.B. Jamieson, D.A. Patsios, 2013). Проводилось исследование, которое выявило, что у 47% пациентов с НТМ легочной патологией была полость по сравнению с 9% пациентов с другими диагнозами (W.J. Koh, K.S. Lee, 2005). Пациентов с иммунокомпетентными заболеваниями на КТ чаще отмечаются полости, чем у иммунокомпетентных пациентов, но в остальном рентгенологические данные сходны (Y. Lee, J.W. Song, 2013). Полостная НТМ легочная патология рентгенологически и клинически неотличима от туберкулеза легких, что судя по всему приводит к ошибочной диагностике в малообеспеченных туберкулезно-эндемичных регионах (M. Maiga, S. Siddiqui и др., 2012).

1.6. Иммунологическая диагностика

Так как НТМ легочной патологии не имеют специфический характер, ограниченность рентгенографии, а также для постановки диагноза часто требуются инвазивные процедуры, необходимы и другие диагностические методы. Кожное тестирование с использованием антигенов НТМ не было полезно для диагностики заболевания НТМ. Реактивность кожного теста на антигены НТМ является общей для здоровых людей, и существует иммунологическая перекрестная реактивность между НТМ и туберкулезом (С.F. von Reyn, С.R. Horsburgh и др., 2001). Интерферон гамма анализы высвобождения были использованы для диагностики туберкулезной инфекции, но ни один из них не является коммерчески доступным для НТМ. Эти анализы вряд ли будут полезны для диагностики НТМ, так как пациенты с легочной болезнью МАС на самом деле демонстрируют меньшее высвобождение гамма-интерферона в ответ на антигены МАС, чем люди без заболевания, у которых есть положительный ответ теста кожи на Mac sensiti (R. Vankayalapati, B. Wize и др., 2001). Серодиагностические анализы, которые обнаруживают антитела против специфических микобактериальных антигенов, все чаще тестируются на МАС и *M. abscessus*. Один анализ, который был исследован, использует иммуноферментный анализ, который обнаруживает: IgA антитела, которые связываются с гликопептидолипидом, который находится в клеточной стенке МАС (S. Kitada, A. Levin, 2005). Второй серодиагностический тест исследует антитела к микобактериальному антигену A60 в качестве диагностики *M. abscessus* легочное заболевание. Титры антитела A60 были обнаружены относительно чувствительными (86,7%) и специфичными (95,1%) для *M. abscessus* легочной патологии среди пациентов с ХФ и, по-видимому, коррелировали с активностью заболевания (A. Ferroni, I. Sermet-Gaudelus, M. Le Bourgeois, C. Pierre-Audigier, C. Offredo, M. Rottman, 2005). К сожалению, антиген A60 не специфичен для *M. abscessus*, и эти антитела могут повышаться при других микобактериальных заболеваниях, таких как

туберкулез (Z.A. Bukhary, 2007). Но ни один из данных серологических исследований не готов к клиническому использованию, они предполагают собой направление изучений, которое имеет возможность весомо продвинуть диагностику НТМ легочной патологии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

2.1. Взятие биоматериала

В оборудованной комнате осуществляется забор клинического материала. Чтобы приблизить к достоверному результату исследование, в помещение должна работать вентиляция под отрицательным давлением, которая позволяет поддерживать в комнате отрицательное давление по отношению к окружающей зоне. Если такая возможность отсутствует, то собирать материал позволено в используемой только для сбора мокроты пустой комнате с открытыми окнами. В момент процесса сбора запрещается вход в комнату других пациентов или членов семьи больного. Медицинские работники, который контролируют сбор мокроты, обязаны соблюдать правила техники безопасности и осуществлять забор только в халате, шапочке, маске и резиновых перчатках. Так же допускается сбор в домашних условиях, который должен происходить в отсутствие близких, перед открытым окном.

Утром до еды после процедуры чистки зубов происходит процесс сбора мокроты (Попковский М. А., Кривовнос П. С., Ломако М. Н., 2001).

Материал для исследования на микобактерий нужно собирать в стерильные контейнер с удобным, плотно закручивающийся крышкамой. Герметизированных контейнер применение, основываясь на 2 функции:

- исключение проникновения клинического материала в окружающую среду
- защита содержимого флакона от бактерий, которые находятся в окружающей среде.

Вследствие этого контейнер для сбора клинического материала обязан отвечать ряду требований:

- материала для изготовления контейнера должен быть прочным, чтобы не было просачивания жидкости

- должны иметь герметичную крышку, чтобы предотвратить возможное распространение инфекции;
- объем флаконов должен составлять 20-50 мл, чтобы материала хватило для диагностики;
- контейнеры должны иметь широкое отверстие для сбора мокроты (не менее 35 мм в диаметре), чтобы пациент мог легко сплевывать мокроту внутрь флакона, чтобы не произошло загрязнения внешней поверхности;
- контейнеры должны быть изготовлены из прозрачного материала чтобы была возможность оценить количество и качество собранной пробы, не открывая крышку;
- контейнер должен без затруднений подвергаться маркировке и надежно сохранять ее в период хранения, транспортировки и проведения исследования.

При отсутствии одноразовых контейнеров можно применять толстостенные флаконы из стекла (карманные плевательницы). При многократном использовании флаконы проходят стерилизацию в автоклаве. При этом во избежание лабораторного загрязнения лаборатория должна постоянно проводить контроль качества мытья и стерилизации флаконов (Митрофанова Н.А, Пылаева Ю.В., 2013).

Алгоритм действия:

1. Берется мокрота в день исследования утром натощак.
2. Номеруется плевательная банка.
3. Оформите направление в бактериологическую лабораторию.
4. Расскажите правила о сборе мокроты с пациентом.
5. Закройте плевательницу плотной крышкой.
6. Обработайте наружную поверхность плевательницы салфеткой, смоченной в дезрастворе.

7. Осмотрите собранную мокроту, упакуйте плевательницу в металлический бикс.

8. Доставьте мокроту в бактериологическую лабораторию.

9. Вымойте руки.

В период транспортирования биологический материал больного нужно защитить от воздействия прямых солнечных лучей и тепла. Для этого используют биксы или специальными транспортировочные ящики с мягкими легко стерилизующимися прокладками на дне или с прокладками для флаконов или пробирок. Диагностический материал находясь во флаконе обязан быть плотно закупоренным (Лаптева И. М., Королева Е. Г., 2004).

2.2. Микроскопическое исследование

Для определения морфологии клеток и их тинкториальных свойств, из части исследуемой колонии готовят мазок и окрашивали по методу Циэля-Нильсена.

Подготовка к анализу:

1) Предметное стекло перед исследованием должно быть тщательно вымыто и обезжирено смесью для обезжиривания предметных стекол.

2) Перед использованием фуксин Циля разводят в 10 раз дистиллированной водой (из расчета – к 1 мл фуксина добавляют 9 мл дистиллированной воды).

3) Приготавливают рабочий раствор метиленового синего, для этого растворяют 0,3 г хлорида метиленового синего в 100 мл дистиллированной воды.

4) Разжижают мокроту с использованием 2% *N*-ацетил-L-цистеина и 5-6% NaOH, а после центрифугируют.

Приготовление мазков:

1) На обезжиренное предметное стекло деревянной палочкой-аппликатором наносят 2-3 гнойных комочка, равномерно распределяя по центру.

2) Просушить мазок на воздухе при комнатной температуре.

Фиксация достигается посредством несильного нагревания (примерно до 70°C) предметного стекла, которое для этого трижды проводят над пламенем спиртовки мазком вверх в течение 5 секунд.

После фиксации мазок окрашивают фуксином Циля в течении 4 мин. Обесцвечивают 25% раствором серной кислоты в течение 1-2 мин. Затем промывают водой и докрашивают 3-5 мин метиленовым синим.

Дальше приступают к микроскопированию с иммерсией в световом микроскопе (увеличение x100, окуляр x10). При качественной окраске карболовым фуксином в микобактериях туберкулеза можно обнаружить различное количество гранул более плотной окраски. Микроорганизмы, располагающиеся поодиночке, парами или в виде групп, хорошо выделяются на голубом фоне других компонентов препарата. Нередко в нативных препаратах бактериальные клетки могут располагаться в виде римской цифры V, встречаются изогнутые и извитые варианты

2.3. Культуральный метод

Для выделения микобактерий используется среда Левенштейна–Йенсена с добавлением яичной эмульсии.

Ход приготовления питательной среды:

Размешать 37,24 г порошка в 600 мл дистиллированной воды. Прокипятить в течение 1 минуты до полного растворения агара. Стерилизовать автоклавированием при 121°C в течение 15 мин. Приготовить стерильно 1000 мл эмульсии яиц. После добавить к 1000 мл яичной эмульсии 600 мл основы среды. Тщательно перемешать и разлить в стерильные пробирки. Поместить пробирки в наклонном положении для

формирования скошенной среды и прогревать (для коагуляции) при 85⁰С в течение 45 мин.

Для разграничения *M. tuberculosis* и НТМ все изоляты оценивали по темпам роста, морфологии колоний и пигментации, а также с помощью полимеразной цепной реакции (Koh W.J. , Kwon O.J. и др, 2006).

2.4. Технология MALDI-ToF MS

Подготовка образца заключается в том, что в суспензию из колоний микобактерий добавляют этанол, а потом специальную матрицу, которой является 2',5'дигидроксibenзойная кислота, смешивают на специальной подложке масс-спектрометра.

Затем образец помещают в прибор, и на него воздействуют наносекундные лазерные импульсы. В это время происходит взаимодействие молекул матриц с белками. Программа оценивает время пролета частиц, а потом преобразует эту информацию в спектр молекулярных масс. Масс-спектр данного микроорганизма сравнивается со спектрами из базы данных, и основываясь на сведениях происходит идентификация микобактерий. Время определения вида бактерий зависит от количества образцов.

2.5.Выделение ДНК

Для выделения ДНК микобактерий из клинического материала используют «Амплитуб-Преп» инактивирующий реагент. Обладает исключительными муколизующими свойствами, благодаря которым может использоваться вместо раствора NALC-NaOH для обработки мокроты перед молекулярно-генетическими исследованиями. Полностью убивает микобактерии в клиническом материале, культуре клеток. Сохраняет ДНК при транспортировке и хранении клинического материала в течение 1 месяца.

Клинические и технические испытания «Амплитуб-Преп» (инактивирующего реагента) проводились в ЦНИИ туберкулёза (Москва). 118 образцов мокроты от тяжёлых бациллярных больных с острым течением туберкулёза делили на две части, обрабатывали одну часть Амплитуб-Преп, NALC-NaOH.

Все образцы тестировали на BACTEC MGIT 960 и методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Рост микобактерий наблюдался только в контрольной группе, обработанной NALC-NaOH. В образцах, обработанных «Амплитуб-Преп», рост микобактерий не обнаружен. Результаты ПЦР-анализа образцов из обеих групп были положительными.

2.6. Пан-микобактериальный 16S ген рРНК ПЦР

Методы основаны на использовании полимеразной цепной реакции, которые способна выявить и воспроизвести копий участка ДНК, принадлежащий болезнетворному агенту.

При отрицательном отношении к комплексу *M. tuberculosis* штамм микобактерий был идентифицирован с помощью Пан-микобактериальной 16S ПЦР гена рРНК и, при необходимости, Пан-микобактериальной ПЦР groV, а также Пан-микобактериальной ПЦР hsp65.

Пан-микобактериальная ПЦР нацелена на ген 16S рРНК. ПЦР была выполнена с помощью реакционной смеси приготовленная по методу описанный в статье Boddinghaus, B., T. Rogall, T. Flohr, H. Blocker, and E. C. Bottger. 1990.

В пробирку заливают 50 мм KCl, добавляется 10 мм Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 мм MgCl₂, 0,01% (мас./об.) гелия, 200 мм дезоксинуклеозид трифосфат, 1,25 ЕД Taq полимераза (Perkin-Elmer Cetus, Uberlingen, Германия), после вводится 30 ммоль прямой праймер 5' - TGCACACAGGCCACAAGGGA-3' и обратный праймер 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', которые являются специфичными для рода *Mycobacterium* (Greub G, Sahli R, Brouillet R, Jaton K, 2016). К реакционной смеси добавляется нативный образец.

Содержимое пробирок перемешали на вортексе на максимальной скорости в течение 2 мин. Готовую смесь наносят на реакционный планшет в лунки. Закрывают лунки прозрачной пленкой.

Во время проведения реакции поддерживается температура на уровне 70°C. Тепловой профиль участвуют 39 циклы с 1-минутным шагом денатурации при 94°C и 3-минутным шагом денатурации при 94°C. стадия отжига и удлинения при 68°C.

В течение исследуемого периода была проведена вложенная ПЦР для повышения чувствительности этого метода, применяемого непосредственно на клинических образцах. Он состоял в использовании пары праймеров, вложенных (NF5'- СТТААСАСАТГСААГТЦГААС-3'и NR 5'-TTTCACAACAACGCGACAA-3') в первый продукт амплификации. Это значительно улучшает чувствительность из-за двойной амплификации, но риск загрязнения выше.

Продукт этой двойной амплификации затем секвенировали праймером 5'-CCCACTGCTGCCTCCCTAG-3'и праймером 5'-СТТААСАСАТГСААГТЦГААС-3', и полученную нуклеотидную сигнатурную последовательность сравнивали с другими сигнатурными последовательностями, что позволяет определить название микобактериального вида, который был амплифицирован (Giulieri S, Morisod B, Edney T, Odman M, Genne D, Malinverni R et al, 2011, Slany M, Pavlik I, 2012).

2.7. Широкоспектральная микобактериальная ПЦР

Широкоспектральная микобактериальная полимеразная цепная реакция, направленная на кодирующий ген 16S рРНК, была использована непосредственно на нативных образцах для амплификации микобактериальной ДНК (Kirschner P, Springer B, Vogel U, 1993). Для повышения чувствительности была проведена 2-ступенчатая вложенная

ПЦР (прямая вложенная праймер 271 5'-CTTAACACATGCAAGTCGAAC - 3'; Обратная вложенная праймер 259 5'-TTTCACAACAACGCGACAA-3'), амплифицирующая продукт 550 bp, с последующим прямым секвенированием.

Как *Mycobacterium haemophilum* сильно подозревали на основании результатов ПЦР, культуру устанавливали в пробирки MGIT, дополненные 0,2 мл гемина (Sigma-Aldrich), в концентрации 1,6 мг/мл, а также на плитках шоколадного кровяного агара. Все культуры инкубировали при 30°C в течение 8 недель. Для положительных культур идентификацию изолятов микобактерий проводили путем секвенирования (Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, 2007).

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Анализ микроскопического исследования

Клеточная стенка микобактерий имеет содержит значительно большее количество липидов. Большинство микобактерий не имеют чувствительность к анилиновым красителям, что является созданием дополнительные трудности в диагностике микобактериозов.

Использование особых способов окраски по методу Циля — Нельсена и восприимчивость к флюорохромным красителям (аурамин и родамин) дает вероятность обнаружить микобактерии в клиническом материале, но не позволяет выполнить дифференциальную диагностику НТМБ с микобактериями туберкулезного комплекса (Севастьянова, Э.В., 2008).

3.2. Анализ культурального метода

Культивирование микобактерий на питательных средах один из методов диагностики микобактериозов. Питательная среда, использование добавок и поддержание оптимальной температуры культивирования имеет большое значение в этом методе (Майрова, А., 2007). Культивирование НТМ имеет ряд отличий от культивирования микобактерий туберкулеза. Во-первых, высокая неоднородность данной группы микроорганизмов усложняет процесс культивирования. Общепринятой методикой выделения микобактерий из клинического материала считается культивирование на плотных (Финн-II, Левенштейна — Йенсена) и жидких (Миддлбрук) средах (Springer, B., 1996).

Во всяком случае вопрос о выборе оптимальной комбинации среды при выделении НТМ из клинического материала является открытым по сей день. Потому что при использовании исключительно жидких питательные среды, есть риск не выделить из материала такие медленно растущие микобактерии, как *M. xenopi*, которые отличаются значительно замедленным метаболизмом. Но в тоже время, слишком активный рост

некоторых быстрорастущих НТМ может быть косвенно расценен как контаминация материала сапрофитной микрофлорой. Из этого следует необходимость визуальной оценки всех отрицательных флаконов с использованием, либо прямой микроскопии, либо посева на плотные питательные среды. Если использовать только плотные питательные среды, ограничивается возможность выделения некоторых микроорганизмов из НТМ из-за особенностей их метаболизма. Различия в температурном оптимуме при культивировании некоторых НТМ также затрудняет выделения всех микобактерий. После того как была получена культура, необходима правильная идентификация микобактерий, так как от этого зависит правильная постановка диагноза и подбор лекарственных средств больному.

Биохимическая идентификация НТМ основывается на определении нитратредуктазной, арилсульфатазной, амидазной активности (утилизация ацетамида, мочевины, никотинида, пиразинамида, аллантаина, сукцинамида), способности выделить каталазу, гидролизировать Твин-80, восстанавливать теллурид калия, расти на средах с хлористым натрием.

Результаты микробиологии не могут быть интерпретированы без клинических и рентгенологических данных пациента, чтобы определить, действительно ли у пациента есть НТМ легочное заболевание.

3.3. Анализ технологии MALDI-ToF MS

MALDI-ToF MS обнаруживает обилие белков с определенным соотношением массы к заряду, которое отображается в виде спектра. Затем спектральные данные сравниваются с базой данных для определения вероятной идентичности организма. Лаборатории, использующие MALDI Biotyper, должны создавать свои собственные базы данных или полагаться только на исследовательские базы данных для своих лабораторных разработанных протоколов (Buckwalter SP, Olson SL и др., 2016). Были

описаны исследования, которые продемонстрировали способность MALDI-TOF MS выявлять клинически значимые микобактерии (Lotz A, Ferroni A, Beretti JL, и др., 2010)

Нанесение колонии непосредственно на мишени не действуют на микобактерии из-за их сложной клеточной стенки. Стадия предварительной обработки материала должна быть выполнена, с отбиванием шариков или завихрением в этаноле, ацетонитриле и муравьиной кислоте (Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. 2014.).

3.4. Анализ молекулярно-генетической идентификации НТМ

В более специализированных лабораториях научного профиля используется молекулярно-генетическая идентификация микобактерий по гену 16S рРНК, который обладает высокой консервативностью: отличия в последовательности даже на 1% (и более) обычно позволяют говорить о видовом различии образцов. Результаты секвенирования последовательности 16S рРНК для каждого вида вносятся в общедоступные базы данных, которые служат как для идентификации уже известных НТМБ, так и для регистрации новых видов. Помимо консервативных участков для видовой дифференциации используется анализ двух гипервариабельных последовательностей (так называемые области А и В) в гене 16S rRNA. Как правило, достаточно анализа последовательности области А для определения видовой принадлежности большинства НТМБ. Область В, анализируется в случаях описания новых видов или видов, не дифференцируемых только по области и консервативных последовательностей (Tortoli E., 2003, McNabb, A.D 2004).

3.5. Сравнительная характеристика методов идентификации микобактерий

Метод культивирования имеет недостаток, связанный с большой тратой времени, потому что многие микобактерии культивируются 2-3

недели, что не позволяет быстро определить возбудителя. Так как эти организмы свободно живут в окружающей среде, трудно определить значение одной положительной культуры из респираторного образца, особенно образца мокроты. Например, только 14% корейских пациентов с единственной положительной респираторной культурой для *M. abscessus*, *M. kansasii* или *M. abscessus* впоследствии были диагностированы с НТМ легочной болезнью после медианы 30 месяцев наблюдения (W.J. Koh, B. Chang, Y. Ko, B.H. Jeong, G. Hong, H.Y., 2013). Из-за таких обстоятельств для постановки диагноза НТМ легочной патологии необходимо получить по меньшей мере две положительные культуры из отдельных отхаркиваемых образцов мокроты (D.E. Griffith, T. Aksamit, 2007).

Метод микроскопий экономически выгоден, не требует в покупке специфичного аппарата и большой затраты времени.

Идентификацию MALDI-TOF MS относительно недорого выполнить после первоначального расхода инструмента. Установлено, что это быстрый и точный метод идентификации микобактерий, но он имеет ограниченную библиотеку микобактерий (LaBombardi VJ, Katariwala R, Pipia G. 2006). А также метод зависит от процесса культивирования. К сожалению, это увеличивает время представления отчетности по сравнению с тем, что может быть достигнуто с помощью последовательности (Kellogg JA, Bankert DA, и др. 2001).

Методы, основанные на использовании полимеразной цепной реакции способны выявить и воспроизвести копии участка ДНК, принадлежащей болезнетворному агенту. Этот метод имеет преимущество перед остальными способами идентификации, потому что позволяет избежать процесса культивирования, тем самым увеличивая скорость обнаружения возбудителя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Легочные заболевания, которые были вызваны нетуберкулезными микобактериями, в последнее время стали все более распространенными клиническими заболеваниями. Достижения в области визуализации и микробиологических методов, в частности молекулярный метод, значительно расширили наше понимание этого заболевания, но многие неопределенности остаются, особенно в эпидемиологии и клинической статистике.

Правильная видовая идентификация микобактерий становится все более важной, по мере появления данных об относительной склонности различных нетуберкулезных легочных заболеваний.

Проведенный обзор литературных источников показывает характеристику микобактерий, микобактериозов и разнообразных методов идентификации. Литературные данные позволили проанализировать ценность существующих методов. Систематизация методов в данной работе поможет в дальнейшем разработать более точные системы.

ВЫВОДЫ

1. Наиболее часто среди атипичных *Mycobacterium spp.* встречаются *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* и *M. abscessus*.
2. Оптимальным для выделения ДНК является набор «Амплитуб-Преп», поскольку основан на применении магнитных частиц, что обеспечивает получение максимального количества чистой ДНК и позволяет автоматизировать процесс выделения ДНК.
3. Для молекулярно-генетической детекции и идентификации атипичных *Mycobacterium spp.* в исследуемых образцах может использоваться ген 16S рРНК, отличающийся высокой консервативностью. Данный метод имеет преимущество перед микроскопией, культивированием и даже технология MALDI-ToF MS, так как обеспечивает получение надежных результатов значительно быстрее.
4. Виды *M. intracellulare* и *M. kansasii* являются причиной легочных заболеваний, *M. xenopi* и *M. chelonae* встречается при поражении кожи. А возбудителем лимфаденита является *M. malmoeense*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альварес Фигерра М.В., Леви Д.Т. Этиологическая диагностика заболеваний, вызываемых микобактериями // Инфекционные болезни. – 2014. – Т. 12. – № – С. 95–99
2. Волгина Е.Г. Алгоритмы микробиологической диагностики оппортунистических инфекций // В кн. «Руководство по медицинской микробиологии». Книга III. Т. 2. Оппортунистические инфекции: клинико-эпидемиологические аспекты / Под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Волгиной, Е.П. Ковалевой. – М.: Бином, 2014. – С. 59–68
3. Королева Е Лаптева И. М., Г. Применение метода индуцированной мокроты в диагностике пневмоний // Инструкция по применению. - Минск, - 2004
4. Макарова М.В. Выделение и идентификация нетуберкулезных микобактерий у пациентов фтизиатрических учреждений // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2010. – С. 49.
5. Митрофанова Н.А., Пылаева Ю.В. Сестринское дело во фтизиатрии. //ГЭОТАР-Медиа. 2017 С39-43.
6. Оттен Т.Ф. Микобактериоз // В кн.: Руководство по медицинской микробиологии. Книга III. Том второй. Оппортунистические инфекции: клиникоэпидемиологические аспекты / Под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Волгиной, Е.П. Ковалевой. – М.: Бином, 2014. – С. 349–365.
7. Попковский М. А., Кривовнос П. С., Ломако М. Н. История борьбы с туберкулезом в Беларуси, прошлое и настоящее // Матер. 9-й республиканской научной конференции по истории медицины. - Минск, 2001. - С. 204-206.
8. Прокопьева Н.И., Протодяконова Г.П., Павлов Н.Г. Нетуберкулезные (атипичные) микобактерии, выделенные от животных и людей // Аграрный вестник Урала. – 2011. – № 5 (84). – С. 29–30.

9. Старкова Д.А. *Mycobacterium avium* – актуальный возбудитель микобактериоза человека // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3. – № 1. – С. 7–14
10. Adjemian J., Olivier K.N., Seitz A.E/, Holland S.M., Prevots D.R. Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. Medicare beneficiaries // *Am J Respir Crit Care Med*, 185 (2012), pp. 881-886
11. Alpert J.B., J.P. Fantauzzi, K. Melamud, H. Greenwood, D.P. Naidich, J.P. KoClinical significance of lung nodules reported on abdominal // *CT AJR Am J Roentgenol*, 198 (2012), pp. 793-799
12. Bendien S.A., J. van Ingen, W.C. deLange, W. Hoefsloot, P.N. Dekhuijzen, M.J. Boeree, et al.Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, the Netherlands *Thorax*, 64 (2009), pp. 502-506
13. Bendinger, B., Rijnaarts, H.H.M., Altendorf, K. and Zehnder, A.J.B. (1993) Physiochemical cell surface and adhesive properties of coryneforms bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids // *Appl Environ Microbiol* 59, 3973–3977.
14. Brennan, P.J. and Nikaido, H. (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. Conger N.G., O’Connell R.J., Laurel V.L., Olivier K.N., Graviss E.A., Williams-Bouyer N., et al. *Mycobacterium simiae* outbreak associated with water supply hospital. // *Infect Control Hosp Epidemiol*. – 2004. – Vol. 25. – P. 1050-55.
15. Buckwalter SP, Olson SL, Connelly BJ, Lucas BC, Rodning AA, Walchak RC, Deml SM, Wohlfel SL, Wengenack NL. 2016. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of *Mycobacterium* species // *Nocardia* species, and other aerobic actinomycetes. *J Clin Microbiol* 54:376–384.doi: 10.1128/JCM.02128-15.
16. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. // *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 3963–3967.

17. Falkingham JO 3rd (2013) Ecology of nontuberculous mycobacteria--where do human infections come from? //Semin Respir Crit Care Med 34(1):95–102
18. Falkingham III J.O. Nontuberculous mycobacteria in the environment// Clin. Chest Med. – 2002. – Vol. 23. – P. 529–551
19. Fowler S.J., J. French, N.J. Screaton, *et al.* Nontuberculous mycobacteria in bronchiectasis: prevalence and patient characteristics Eur Respir J, 28 (2006), pp. 1204-1210.
20. Giulieri S, Malinverni R Edney T, Odman M, Morisod B Genne D, *et al* (2011) //Outbreak of Mycobacterium haemophilum infections after permanent makeup of the eyebrows. Clin Infect Dis 52(4):488–491.
21. Griffith D.E., T. Aksamit, B.A. Brown-Elliott, *et al.* An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases Am J Respir Crit Care Med, 175 (2007), pp. 367-416.
22. Hoefsloot Ingen, C. Andrejak, K. Angeby, R. Bauriaud, P. Bemer, *et al.* The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study Eur Respir J, 42 (2013), pp. 1604-1613.
23. Hoffman, C.A., Leis, M., Niederweis, M., Plizko, J.M. and Engelhardt, H. (2008)
24. Inderlied C.B., LEM Bermudez CA Kemper, комплекс микобактерий авиума //Clin Microbiol Rev, 6 (1993), pp. 266-310
25. Jarlier, V. and Nikaido, H. (1994) Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. // FEMS Microbiol Lett 123, 11–18.
26. Jatton K, Greub G (2007) PCR in microbiology: from DNA amplification to results interpretation. Rev Med Suisse 3(106):931–2, 4-8
27. Jing H., H. Wang, Y. Wang, Y. Deng, X. Li, Z. Liu, *et al.* Prevalence of nontuberculous mycobacteria infection // China, 2004–2009 Emerg Infect Dis, 18 (2012), pp. 527-528.

28. Kasperbauer S, Huitt G (2013) Management of extrapulmonary nontuberculous mycobacterial infections. // *Semin Respir Crit Care Med*. 34(1):143–150.
29. Kellogg JA, Bankert DA, Withers GS, Sweimler W, Kiehn TE, Pfyffer GE. 2001. Application of the Sherlock Mycobacteria Identification System using high-performance liquid chromatography in a clinical laboratory. // *J Clin Microbiol* 39:964–970. doi: 10.1128 /JCM.39.3.964-970.2001.
30. Koh W.J., Kwon O.J., K. Jeon, *et al.* Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory // specimens in Korea *Chest*, 129 (2006), pp. 341-348
31. LaBombardi VJ, Katariwala R, Pipia G. 2006. The identification of mycobacteria from solid media and directly from VersaTREK Myco bottles using the Sherlock Mycobacteria Identification HPLC system. *Clin Microbiol Infect* 12:478–481. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01373.x.
32. Lai C.C., Y.T. Huang, C.K. Tan, H.L. Hsu, C.H. Liao, C.H. Chou, *et al.* Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000–2008 *Emerg Infect Dis*, 16 (2010), pp. 294-296.
33. Lotz A, Jarlier V, Ferroni A, , Dauphin B, Carbonnelle E, Guet-Revillet H, Veziris N, Heym B, , Gaillard JL, Pierre-Audigier C, Frapy E, Berche P, Nassif X, Beretti JL, Bille E. 2010. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. // *J Clin Microbiol* 48:4481–4486. doi: 10.1128/JCM.01397-10
34. Maiga M., S. Siddiqui, S. Diallo, B. Diarra, B. Traore, Y.R. Shea, *et al.* Failure to recognize nontuberculous mycobacteria leads to misdiagnosis of chronic pulmonary tuberculosis *PLoS One*, 7 (2012), p. e36902
35. Marras T.K. , Marchand-Austin, K. May, F.B
D. Mendelson, . Jamieson Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Ontario, Canada, 1998–2010 *Emerg Infect Dis*, 19 (2013), pp. 1889-1891.

36. Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. 2014. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. *J Clin Microbiol* 52:130–138. doi: 10.1128/JCM.01996-13
37. Mazza-Stalder J, Jatton-Ogay K, Nicod L (2009) Non-tuberculous mycobacteria pulmonary disease: what's new? // *Rev Med Suisse*. 5(226):2344–2346 8-50
38. McGarvey J., Bermudes L. Phenotypic and genomic analyses of the *Mycobacterium avium* complex reveal differences in gastrointestinal invasion and genomic composition // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69. – P. 7242–7249
39. Mello, K.G., V. Rolla, R.S. Duarte, L. Borga E.P. Sampaio, *et al.* Clinical and therapeutic features of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Brazil, 1993–2011. *Emerg Infect Dis*, 19 (2013), pp. 393-399.
40. Morimoto K., K. Iwai, K. Uchimura, M. Okumura, T. Yoshiyama, K. Yoshimori, *et al.* A steady increase in nontuberculous mycobacteriosis mortality and estimated prevalence in Japan // *Ann Am Thorac Soc*, 11 (2014), pp. 1-8
41. Opota O, Mazza-Stalder, Prod'homme G, J, Tissot F, Senn L Greub G *et al* (2016) Added value of molecular assay Xpert MTB/RIF compared to sputum smear microscopy to assess the risk of tuberculosis transmission in a low-prevalence country. // *Clin Microbiol Infect* 22(7):613–619
42. Park S., G.Y. Suh, M.P. Chung, *et al.* Clinical significance of *Mycobacterium fortuitum* isolated from respiratory specimens // *Respir Med*, 102 (2008), pp. 437-442.
43. Philley JV, Griffith DE (2019) Medical management of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease. *Thorac Surg Clin* 29(1):65–76
44. Primm T.P., Falkinham J.O Lucero C.,. Impact on health of environmental mycobacteria // *Clin Microbiol Rev.* – 2004. – Vol. 17. – P.98–106.

45. Prevots D.R., T.K. Marras Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review // Clin Chest Med, 36 (2015), pp. 13-34.

46. Prevots, D. Strickland, L.A. . Raebel, Jackson, M.A M.A. Blosky P.A. Shaw, *et al.* Nontuberculous mycobacterial lung disease prevalence at four integrated health care delivery systems Am J Respir Crit Care Med, 182 (2010), pp. 970-976.

47. Rossi M., Flepp M., Telenti A., Schiffer V., Egloff N., Bucher H., Vernazza P., Bernasconi E., Weber R., Rickenbach M., Furrer H. Disseminated M. avium complex infection in the swiss HIV cohort study: declining incidence, improved prognosis and discontinuation of maintenance therapy // Swiss Med. Wkly. – 2001. – Vol. 131. – P. 471–478.

48. Shao Y., C. Chen, H. Song, G. Li, Q. Liu, Y. Li, *et al.* The epidemiology and geographic distribution of nontuberculous mycobacteria clinical isolates from sputum samples in the eastern region of China PLoS Negl Trop Dis, 9 (2015), p. e0003623

49. Simons S., J. van Ingen, P.R. Hsueh, N. Van Hung, P.N. Dekhuijzen, M.J. Boeree, *et al.* Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, eastern Asia Emerg Infect Dis, 17 (2011), pp. 343-349.

50. Slany M, Pavlik I (2012) Molecular detection of nontuberculous mycobacteria: advantages and limits of a broad-range sequencing approach. J Mol Microbiol Biotechnol 22(4):268–276.

51. Szymanski E.P., J.M. Leung, C.J. Fowler, C. Haney, A.P. Hsu, F. Chen. Pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. A multisystem, multigenic disease Am J Respir // Crit Care Med, 192 (2015), pp. 618-628.

52. Thomson R.M. Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections // Emerg Infect Dis, 16 (2010), pp. 1576-1583.

53. Thomson R.M., R. Carter, C.. Coulter, F. Tolson, C Huygens, M. Hargreaves Factors associated with the isolation of nontuberculous mycobacteria

(NTM) from a large municipal water system in Brisbane, // Australia BMC Microbiol, 13 (2013), p. 89

54. Wickremasinghe M., , G. Davies, L.J. Ozerovitch *et al.* Non-tuberculous mycobacteria in patients with bronchiectasis // Thorax, 60 (2005), pp. 1045-1051

55. Winthrop, , B. Kendall, A. Marshall-Olson, C. Morris, E. McNelley M. Cassidy, *et al.* Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease Am J Respir Crit // Care Med, 182 (2010), pp. 977-982



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	Шайдуллина Алия Дамировна
Подразделение	Медико-профилактический факультет с отделением биологии ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ
Тип работы	Выпускная квалификационная работа
Название работы	РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ Mycobacterium spp. В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ
Название файла	Шайдуллина А.Д Б-401 ФПМ.docx
Процент заимствования	8.57 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	18.00 %
Процент оригинальности	73.43 %
Дата проверки	08:00:34 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	08.06.20 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 дипломная работа студента группы Б-401
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Шайдуллина Алия Дамировна
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: Разработка тест-системы для детекции атипичных *Mycobacterium spp* в клиническом материале.

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и графического материала, соответствие работы заданию
Объем текстовой части 46 листа А4, 3 рисунка, 1) Литературный обзор: Анализ характеристики нетуберкулезных микобактерий (19 с.). 2) Материалы и методы исследования: методика проведения исследования (8 с.). 3) Результаты исследования и их обсуждение. Исследование методов идентификации микобактерий (4 с.). 4) Заключение (2 с.). 5) Список использованных источников (55 наименов.). 6).
Приложения: Приложение А.Б.В.Г. Д.

2 Актуальность темы выпускной квалификационной работы (ВКР). Методы и способы решения конкретных проблем, представленных в ВКР, основные достоинства и недостатки ВКР. Микобактерии все чаще признаются возбудителями заболеваний. Так как данное исследование учитывает важную этиологическую роль условно-патогенных нетуберкулезных микобактерий, неспецифические клинические проявления указывают на необходимость нахождения методов идентификации микобактерий

3 Умение самостоятельно и творчески решать задачи, поставленные в задании на выполнение ВКР, подготовленность к выполнению профессиональных задач Выпускник проявил отличное умение самостоятельно и творчески решать поставленные задачи, практическая и теоретическая подготовленность на отличном уровне, выпускник готов к выполнению профессиональных задач.

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

5 Умение пользоваться справочной, научной, научно-технической и патентной литературой, в том числе зарубежной. выпускник показал отличное умение использовать справочную, научную, научно-техническую и патентную литературу

6 Соблюдение календарного графика подготовки ВКР При выполнении квалификационной работы выпускником были соблюдены график подготовки

7 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала ВКР в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствии 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

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

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 результаты полученные в процессе исследования, могут быть использованы в дальнейшей реализации в учебном процессе

11 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно") и рекомендация о присвоении квалификации. «Отлично»

Руководитель выпускной квалификационной работы

Мавзютов Айрат Радикович, профессор

(Фамилия, имя, отчество, должность)

(Подпись)

« » 20 года

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломная работа студента группы Б-401
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)
Шайдуллина Алия Дамировна
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: Разработка тест-системы для детекции атипичных *Mycobacterium spp* в клиническом материале.

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.
Объем текстовой части 46 листа А4, 3 рисунка, 1) Литературный обзор: Анализ характеристики нетуберкулезных микобактерий (19 с.). 2) Материалы и методы исследования: методика проведения исследования (8 с.). 3) Результаты исследования и их обсуждение. Исследование методов идентификации микобактерий (4 с.). 4) Заключение (2 с.). 5) Список использованных источников (55 наименований).

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения
В данной работе указаны методы, позволяющие определить возбудителя микобактериоз

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы.
квалификационной работы выполнена полностью

4 Техничко-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств при написании работы
использовались следующие программы: Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint, владение программ хорошее

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

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач.
выпускник показал отличное умение использовать справочную, научную, научно-техническую и патентную литературу

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
В работе выводы были сделаны на основании литературных данных

10 Замечания по усмотрению рецензента
Отсутствие экспериментальных действий

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др.
результаты полученные в процессе исследования, могут быть использованы в дальнейшей реализации в учебном процессе

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

Рецензент
Зав. ЦНИЛ, доцент кафедры ФПМ
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрав России
(Место работы, занимаемая должность)

Моч

Мочалов К.С.
(Инициалы и фамилия)

М.П.*

« ____ » _____ 20 ____ года

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломная работа студента группы Б-401
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)
Шайдуллина Алия Дамировна
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: Разработка тест-системы для детекции атипичных *Mycobacterium spp* в клиническом материале.

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.

Объем текстовой части 46 листа А4, 3 рисунка, 1) Литературный обзор: Анализ характеристики нетуберкулезных микобактерий (19 с.). 2) Материалы и методы исследования: методика проведения исследования (8 с.). 3) Результаты исследования и их обсуждение. Исследование методов идентификации микобактерий (4 с.). 4) Заключение (2 с.). 5) Список использованных источников (55 наименований).

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения

В данной работе указаны методы, позволяющие определить возбудителя микобактериоз

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы.
квалификационной работы выполнена полностью

4 Техничко-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств при написании работы
использовались следующие программы: Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint, владение программ хорошее

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

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач.
выпускник показал отличное умение использовать справочную, научную, научно-техническую и патентную литературу

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
В работе выводы были сделаны на основании литературных данных

10 Замечания по усмотрению рецензента Отсутствие экспериментальных действий

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др. результаты полученные в процессе исследования, могут быть использованы в дальнейшей реализации в учебном процессе

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

Рецензент
Кандидат биологических наук,
доцент кафедры специальной химической технологии
ФГБОУ ВО УГНТУ
(Место работы, занимаемая должность)

 Бикмурзина З.Р.
(Инициалы и фамилия)

М.П.*
« » 20 года



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

БИПАЛОВ И.И., ШАЙДУЛЛИНА А.Р.

В НОМИНАЦИИ

ПЕРВЫЕ ШАГИ В НАУКЕ

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ А.Т. ВОЛКОВА, Г.З. БАТЫРОВА

83-й ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

СТУДЕНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

«ВОПРОСЫ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ПРАКТИЧЕСКОЙ
МЕДИЦИНЫ»

г. Уфа, 23 апреля 2018 г.

Ректор БГМУ



В.Н.Павлов



Сертификат

Шайдуллина Алия Дамировна

принял(а) участие в работе школы-семинара

HTSDD-2018
High throughput screening in drug discovery

состоявшейся 13 июня 2018 г. в городе Уфа
в рамках Государственного контракта РНФ "Новый рациональный
подход к разработке антибактериальных и противоопухолевых
лекарственных молекул с применением технологии ВПС"

Председатель программного комитета
к.б.н. Иваненков Ян Андреевич



