

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**Медико – профилактический факультет с отделением микробиологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии**

Мурзина Карина Альбертовна

**ГЕНЫ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ КАК
МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАРКЕР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ УСЛОВНО-
ПАТОГЕННЫХ *ENTEROBACTERIACEAE***

Научный руководитель:
д.б.н.

Б.Р. Кулуев

Уфа – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень условных обозначений (сокращений).....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1. СИСТЕМАТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ.....	7
1.1.1. Систематика энтеробактерий.....	7
1.1.2. Характеристика некоторых родов семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	8
1.1.3. Идентификация энтеробактерий.....	9
1.2. Микрообъёмная биохимическая идентификация энтеробактерий.....	10
1.3. Роль условно – патогенных энтеробактерий в развитии ассоциированных инфекций.....	12
1.4. Молекулярно – генетическая характеристика патогенного потенциала энтеробактерий.....	16
1.5. Этиологическая структура заболеваемости острыми кишечными инфекциями.....	19
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	32
2.1. Сбор коллекции клинических штаммов.....	32
2.2. Выделение бактериальной ДНК.....	32
2.3. Амплификация участков ДНК геномов микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции.....	34
2.4. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле.....	36
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
3.1. Анализ представленности патогенных и условно-патогенных <i>Enterobacteriaceae</i> в исследуемом клиническом материале	38
3.2. Сравнительный анализ генотипических и фенотипических методов определения видового состава микробиоты.....	47

3.3. Амплификация участков ДНК, кодирующих факторы патогенности условно – патогенных микроорганизмов.....	55
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	60
ВЫВОД.....	62
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	63
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	73

Перечень условных обозначений (сокращений)

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ОКИ – острые кишечные инфекции

УПМ – условно – патогенные микроорганизмы

УПЭ – условно – патогенные энтеробактерии

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭИКП – энтероинвазивная кишечная палочка

ЭТКП – энтеротоксигенная кишечная палочка

ЭГКП – энтерогеморрагическая кишечная палочка

НК – нуклеиновая кислота

ТАЕ – трис - ацетатный буфер, содержащий трис, уксусную кислоту и ЭДТА

CDT - cytolethal distending toxins

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Инфекционные заболевания в настоящее время широко распространены в России и за рубежом. При этом в её структуре наиболее высок удельный вес острых кишечных инфекций (ОКИ), которыми по данным ВОЗ ежегодно болеет свыше 2 млрд человек. Особенно часто встречается дисбиоз кишечника, от которого, по данным различных исследователей, в той или иной степени страдает до 90 % населения страны [Блохина И.Н., 1999; Бондаренко В.М., 1998; Бондаренко В.М., 2007]. В Российской Федерации, по данным Федерального центра Госсанэпиднадзора, в 2009 году на долю детского населения приходится около 60–70 % всех случаев, регистрирующихся в разных возрастных группах эпизодов инфекционной диареи [Соболева Н.Г., 2010]. Отмечают, что частота эпизодов диареи у грудных детей колеблется от одного до трёх в течение года [Пинегин Б.В., 1984; Самсыгина Г.А., 2003.]. Этиология диареи у грудных детей обусловлена неустойчивым микробиоценозом кишечного тракта, связанного с микробной сукцессией при формировании микробиоты, особенностями иммунной системы, неадекватным иммунным ответом организма на заселение кишечника условно-патогенными микроорганизмами [Немченко У.М., 2011]. Согласно материалам ВОЗ, в развивающихся странах у детей в возрасте младше 5 лет ежегодно возникает около 1 миллиарда эпизодов диареи. Вследствие диареи ежегодно умирает 3 миллиона детей (около 80 % из них - дети в возрасте до 2 лет). ОКИ занимают третье место в этих странах в структуре детской смертности, составляя 15 % всех ее случаев. В 2009 году заболеваемость острыми кишечными инфекциями в Республике Башкортостан составила 1043,3 на 100 тыс. населения и 8753 детей до 17 лет не имеет тенденции к снижению. Уровень лабораторной верификации ОКИ в среднем составил 6-70% по г. Уфа, а по районам республики 10-15% [Шайхиева Г.М. и др., 2014].

Необходимо отметить, что частота распространённости кишечных инфекций напрямую связана с социально-экономическими факторами, питанием, качеством воды, климатогеографическими и иными условиями [Бондаренко В.М., 2007].

Одной из наиболее частых причин кишечных инфекций являются условно-патогенные энтеробактерии. ОКИ, вызванные условно-патогенными энтеробактериями, остаются актуальной патологией, что определяется частотой распространения, тяжестью течения, повышением лекарственной резистентностью возбудителей, изменением этиологической структуры и степени вирулентности указанных энтеробактерий.

Целью работы является молекулярно – генетическая характеристика видового состава микробиоты кишечника и разработка ПЦР тест-систем для идентификации энтеробактерий и этиологической значимости развития в ОКИ.

Задачи исследования:

1. Бактериологическое исследование клинического материала и формирование коллекции клинических штаммов патогенных бактерий.
2. Подбор и синтез праймеров, обеспечивающих идентификацию энтеробактерий и определение «островов» патогенности.
3. Проведение ПЦР-анализа выделенной ДНК для видовой идентификации и поиска «островов» патогенности, интерпретация результатов.
4. Определение взаимосвязи между данными молекулярного анализа и особенностями клинического течения инфекции.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Систематика и идентификация энтеробактерий

Энтеробактерии являются резидентными представителями фекальной нормофлоры человека. Они широко распространены в природе, включая воду открытых водоемов [Джораева С.К. и др., 2015].

Энтеробактерии вызывают широко различные распространенные заболевания у людей, животных и растений. В медицинском аспекте они имеют наибольшую значимость как ведущие возбудители острых кишечных инфекций (дизентерии, сальмонеллеза, брюшного тифа и паратифов, эшерихиозов, псевдотуберкулеза, кишечного иерсиниоза), чумы, оппортунистических и госпитальных инфекций.

1.1.1. Систематика энтеробактерий

В семейство объединено около 40 родов. Представители родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Serratia* могут вызвать у человека как кишечные, так и некишечные оппортунистические инфекции [Джораева С.К. и др., 2015].

Штаммы семейства *Enterobacteriaceae* – это грамотрицательные подвижные палочки 0,3–1,0 x 0,6–1,0 мкм. Они не образуют эндоспоры или микроцисты, не кислотоустойчивы. Растут в присутствии кислорода или без него. Хорошо развиваются в пептонных и мясных средах, обычно на среде Мак Конки. Некоторые используют D-глюкозу как единственный источник углерода, другие требуют в качестве добавок витамины и (или) аминокислоты. Являются органотрофами; механизм метаболизма дыхательный и ферментативный. Не галлофилы. При ферментации D-глюкозы, других углеводов и многоатомных спиртов продуцируют кислоты и видимые объемы газа. Каталазоположительны, за исключением *Shigella dysenteriae* серовара 1 и *Xenorhabdus nematophilus*, оксидазонегативны. Нитраты редуцируют в нитриты, за исключением некоторых штаммов *Erwinia* и *Yersinia*. Содержание Г+Ц в ДНК 38–60

моль %. ДНК видов, принадлежащих к большинству родов, родственны между собой не более чем на 20%. Такая же степень родства и к *Escherichia coli* типовому виду всего семейства. Исключение составляют некоторые виды *Yersinia*, *Proteus*, *Providencia*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, ДНК которых имеют 10-20% родства с ДНК видов, принадлежащих к другим родам. Все изученные виды содержат энтеробактериальный общий антиген (CA), кроме *Erwinia chrysanthemi*. Типовой род – *Escherichia* Castellani и Chalmers 1919 -определен Юридической комиссией Международного комитета систематической бактериологии в 1958 году». Следует отметить, что бактерии *Plesiomonas shigelloides*, включенные в семейство энтеробактерий, имеют оксидазу [Нетрусов А.И., Котов И.Б., 2006]. Согласно второму изданию руководства «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2001) бактерии семейства *Enterobacteriaceae* входят в домен *Bacteria*, филум (тип) – *Proteobacteria*, класс – *Gammaproteobacteria*, порядок – *Enterobacteriales*.

1.1.2. Характеристика некоторых родов семейства энтеробактерии

Семейство *Enterobacteriaceae* разделяются по антигенным свойствам на условно-патогенные (37 родов) и патогенные. Все патогенные виды бактерий семейства *Enterobacteriaceae* могут вызывать у человека острые кишечные инфекции, условно-патогенные – гнойно-воспалительные заболевания и пищевые токсикоинфекции. Заболевания значительно чаще выявляются среди детей раннего возраста, пожилых людей, ослабленных различными заболеваниями.

Наибольшее значение в медицине имеет вид *Escherichia coli*, к которому принадлежат как комменсалы, так и штаммы, вызывающие менингиты новорожденных или гемолитико - уремический синдром.

Клебсиеллы более других распространены в окружающей среде. Обширность их экологической сферы связана со значительной

устойчивостью капсульных форм, способных выдерживать различные факторы, включая воздействие дезинфектантов и высоких температур. Это обуславливает нередкую обсемененность клебсиеллами бытовых предметов, пищевых продуктов, внутрибольничных объектов. Клебсиеллы вызывают пневмонию, урогенитальные инфекции, менингиты, сепсис, острые кишечные инфекции.

Вирулентность рода *Klebsiella* обусловлена главным образом их способностью к адгезии, связанной с капсульным полисахаридом, пилиями и белком наружной клеточной мембраны, что способствует более продуктивной колонизации энтероцитов. Капсула также защищает бактерии от действия фагоцитирующих клеток [Блохина И.Н., 1979; Самсыгина Г.М., 2003].

Протеи распространены в почве, сточных водах, навозе. Встречаются в кишечнике человека и животных. Вызывают гнойно-воспалительные заболевания мочеполового тракта, сепсис, остеомиелит, менингит и др.

1.1.3. Идентификация энтеробактерий

Одним из важных разделов диагностики инфекционных заболеваний является идентификация изолируемых культур микроорганизмов.

При определении таксономического положения патогенных и условно - патогенных бактерий большую роль имеет разработка ускоренных и наиболее доступных способов изучения характеризующих их свойств.

Идентификация бактерий чаще всего проводится по комплексам физиолого-биохимических признаков (определитель "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology").

С 1905 года в лабораторной практике широко применяют универсальные питательные среды для выделения энтеробактерий: Мак-

Конки агар, эозин-метиленовый синий агар (Левина). Для выделения условно - патогенных энтеробактерий (сальмонелл, шигелл, иерсиний, энтеропатогенных эшерихий) используется большой арсенал селективно-дифференциальных сред: сальмонелла – шигелла агар, гектоен - энтерик агар, дезоксихолат - цитратный агар, дезоксихолат – цитрат – лактоза - сульфит агар, ксилоза – лизин - дезоксихолат агар, бактоагар Плоскирева, висмут - сульфит агар, ЦИН – агар и другие. Эти указанные среды не обеспечивают прямой идентификации бактерий, в связи с чем необходимо выделение их в чистой культуре и последующая идентификация широким набором тестов, что длительно и трудоемко.

В целях ускорения исследования, значительного сокращения объема работы и материальных средств в последние годы разработана группа хромогенных питательных сред для одноэтапного выделения и прямой идентификации наиболее частых и значимых в медицине («проблемных») энтеробактерий. Использование хромогенных сред позволяет ускоренно (в течение суток), одноэтапно выделить и одновременно идентифицировать искомые бактерии без проведения дальнейших, дополнительных тестов (или используя 1-2 теста, выполняемых в течение нескольких часов в пределах первых суток).

По таксономическому уровню различают хромогенные питательные среды групповой, родовой, видовой и внутривидовой идентификации. По завершенности исследования среды одноэтапной прямой идентификации подразделяют на среды первичной и окончательной идентификации.

1.2. Микрообъёмная биохимическая идентификация энтеробактерий

В лабораторной практике идентификация видов и биоваров энтеробактерий проводится по их фенотипическим признакам. Основным и наиболее сложным разделом идентификации бактерий является изучение

их биохимических свойств. Повсеместно за рубежом и во многих лабораториях нашей страны биохимическая идентификация микроорганизмов осуществляется микрообъемной технологией. При этом используются специальные микрообъемные тест-системы для автоматических бактериологических анализаторов или различные коммерческие тест-системы биохимической идентификации бактерий для визуального учета. Микрообъемная технология наиболее экономична, проста, пригодна для автоматизации и стандартизации исследований. Автоматические бактериологические анализаторы для микрообъемной биохимической идентификации микроорганизмов и определения их чувствительности к антибиотикам производятся фирмой «Bio Merieux» (Франция): «Vitek» – полностью автоматизированная система для идентификации 99 видов энтеробактерий и неферментирующих бактерий; полуавтоматические системы «ATB Expression» и «Mini API» на основе тест-системы «ID 32E» для идентификации за 2 часа 99 видов энтеробактерий и тест-системы «Rapid ID 32E» для идентификации за 73 часа видов энтеробактерий. Компания «Dade AG» (США) выпускает автоматические бактериологические анализаторы «Walk-Away-0», «Walk-Away-96» и полуавтоматический бактериологический анализатор «Auto SCAN-». Применяются автоматические анализаторы других фирм: Quantum II, Cobas Micro. Указанные приборы имеют высокую стоимость, что ограничивает их применение.

Коммерческие микрообъемные тест-системы по устройству представлены двумя группами: содержащими субстрат реакции в питательной среде или в шаблоне-носителе. Результаты биохимических тестов учитываются визуально, вид микроорганизма устанавливается с помощью таблицы идентификации, кодов (профилей) или компьютерных программ.

Среди тест-систем, основанных на принципе «субстрат в питательной среде» широко используются: API 20E «Bio Merieux»

(Франция); EnterotestI и Enterotest 2, Enterotest 16, Entero-Screen (АО«Lachema», Чехия), мультимикротесты ММТЕ I и ММТЕ 2 (НПО «Аллерген» г. Ставрополь); ПБДЭ (НПО «Диагностические системы» г. Нижний Новгород); «РАПИД-ЭНТЕРО – 200» и «РАПИД-ЭНТЕРО – 50» (НИИЭМ имени Пастера, ОНТ, Санкт-Петербург).

К системам типа «субстрат в шаблоне носителя» относятся коммерческие тест-системы Micro – ID, Minitек.

1.3. Роль условно – патогенных энтеробактерий в развитии ассоциированных инфекций

Патология различных органов и систем человека, вызванная условно-патогенными энтеробактериями является общемедицинской проблемой, поскольку эти энтеробактерии влияют на различные функции организма человека [Фадеев С.Б., 1998; Габидуллин Ю.З., 2015].

Микроорганизмы, которые формируют микрофлору хозяина, находятся между собой в разнообразных взаимоотношениях, таких как, конкуренция, мутуализм, синергизм, комменсализм, паразитизм и другие.

В настоящее время нормальную микрофлору рассматривают как совокупность множества микробиоценозов, занимающих многочисленные экологические ниши на коже и слизистых всех открытых внешней среде полостей макроорганизма и находящиеся в симбиотических отношениях с организмом хозяина. Нормальная микрофлора включает в себя десятки и сотни разнообразных видов, а их общий численный состав у взрослого человека достигает 10^{15} , что почти на порядок больше числа клеток всех тканей и органов макроорганизма.

Основу нормальной микрофлоры человека составляют облигатно и факультативно анаэробные бактерии.

Следует иметь в виду, что до настоящего времени число рутинно культивируемых анаэробных бактерий, составляющих нормальную микрофлору человека, не превышает 7-50% их предполагаемого истинного

количества. Всем известно, что в кишечнике взрослого человека количество микроорганизмов составляет - 10^{13} , в полости рта - 10^{10} , на коже - 10^{12} .

О чрезвычайной сложности состава микрофлоры человека свидетельствует тот факт, что 1 грамм содержимого слепой кишки содержит порядка двух биллионов микроорганизмов, представителей 17 различных семейств, 45 родов и свыше 400 различных видов микроорганизмов. Количество характеристических (постоянно встречающихся) видов относительно невелико, но численно они всегда представлены в значительном количестве [Очилова Р.А., 2004].

Так, например, при изучении качественных и количественных нарушений микробиоты желудочно-кишечного тракта здоровых людей при культуральном методе исследовании кала было выявлено, что в 79% случаев высевались лактобациллы, в 61 % – энтерококки, в 55% – бифидобактерии, в 42% – бактероиды, в 35% – бациллы, в 26% – актиномицеты и пептострепто-кокки, в 17% – кандиды, в 11% – энтеробактерии, в 5% – стафилококки, лептотрихии и клостридии, в 3% – превотеллы и в 1% – листерии [Червинец Ю.В. и др., 2013].

Микробиоценоз макроорганизма человека включает до 1000 видов бактерий, и в определенной степени представлен бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, биологическая значимость которых еще изучена недостаточно.

Условно - патогенные энтеробактерии, могут быть этиологическими факторами гнойно - септических заболеваний, инфекций мочеполового тракта, острых кишечных заболеваний и причиной внутрибольничных инфекций. Многие условно - патогенные бактерии, способны вызывать заболевания не только при снижении естественной резистентности макроорганизма, но и при отсутствии нозологической специфичности [Постникова Е.А., 2004]. Известно, что патогенная и условно - патогенная микрофлора, наиболее часто колонизирующая

различные участки тела человека обладает значительным набором ферментативных свойств и полирезистентностью к широкому спектру антибиотиков [Леванов А.В., 2001], также являясь потенциальным этиологическим фактором развития эндогенных инфекционных заболеваний [Данилина Л.Н. и др., 2012, Заикина О.Л., 1995] и микробная флора биоценоза слизистых оболочек организма хозяина претерпевает изменения у лиц, страдающих различными заболеваниями [Смородова Г.П. и др., 1974]. Анализ особенностей микрофлоры различных участков тела человека, а так же у больных в отделениях интенсивной терапии показал, что у таких больных происходит замещение индигенной микрофлоры на несвойственные в норме энтерококки, стафилококки, грамотрицательные энтеро- и неферментирующие бактерии [Брилис В.М. и др., 1986]. Наблюдение за состоянием условно - патогенной микрофлоры в пред- и после операционный период у хирургических больных, позволило выявить уменьшение колонизационной резистентности слизистой оболочки и увеличение частоты выделения ассоциированных вариаций условно-патогенных бактерий, что возможно отражало влияние на общее состояние пациентов [Черненко Т.В., 2000]. Имеются данные об отрицательном влиянии интоксикации организма, вызванных смешанными инфекциями условно-патогенных бактерий [Абрамзон О.М., 2004; Азнабаев Г.К., 2003; Самсыгина Г.А., 1988]. Условно - патогенные микроорганизмы в виде монокультур или ассоциаций выделяются из мокроты, жидкости, гнойных отделяемых. При этом к числу наиболее часто высеваемых из патологического материала относят бактерии семейства *Enterobacteriaceae* [Абрамзон О.М., 2004; Азнабаев Г.К., 2003; Самсыгина Г.А., 1988].

При этом по данным ряда исследователей [Yamamoto и др., 1987.] обнаружено, что по частоте встречаемости бактерии семейства *Enterobacteriaceae* при ассоциированных инфекционных процессах составляют от 9,3% до 14,5% от общего числа из всех выделенных

условно-патогенных грамотрицательных возбудителей. По мнению же других авторов, высеваемость бактерий семейства *Enterobacteriaceae* при острых кишечных заболеваниях значительно выше и достигает 19,4-39,0% [Костюковская О.Н., 1981; Кочорбаев Т.К., Абдыкеримова Т.А., 1983; Кошнина Е.П., 1984].

Вспышки пищевой токсикоинфекции, вызванной микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae*, были описаны еще в первой половине XX века. Plots J. et al. у больных с пищевой токсикоинфекцией выделили ассоциации энтеробактерий. Описан случай вспышки пищевой токсикоинфекции, вызванный исключительно токсигенными ассоциированными культурами *Enterobacteriaceae*, источником которой явился растительный салат, который удобряли навозом свиней [Туйгунов М.М., 2003].

При исследовании кишечных расстройств в 10% случаев были выделены бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. На возможную роль условно - патогенных энтеробактерий в этиологии кишечных инфекций указывают факты обнаружения повышенных титров специфических антител в сыворотке крови у больных энтеритами, при которых патогенные бактерии не обнаруживались. Так, при обследовании больных детей с острыми кишечными инфекциями в 15% - 20% случаев выделены ассоциации бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, и по мнению ряда авторов энтеробактерии могут вызывать ассоциированную кишечную инфекцию, которая клинически проявляется в форме носительства или дисбактериоза [Семёнов А.В., 2009].

Отметим, что внедрение условно - патогенных бактерий в организм индуцирует системную воспалительную реакцию, сопровождающуюся увеличением концентраций сывороточных цитокинов ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ФНО- α пропорционально форме тяжести, при этом изменение уровней ИЛ-1 α и ФНО- α сопряжено со степенью интоксикации и лихорадкой, низкие

значения ИЛ-6 сопровождают неосложненные формы [Жеребцова Н.Ю., 2006].

За последние 10-15 лет во всем мире наметилась тенденция к увеличению удельного веса заболеваний с пищевым путем передачи в общей структуре кишечных инфекций и бактериальных отравлений.

Нарастающая озабоченность мировой общественности проблемой микробиологической безопасности пищи обусловила появление концепции «эмерджентных пищевых инфекций», в соответствии с которой они рассматриваются не только в медико - генетических аспектах, но и с учетом экологических и технологических факторов, что позволяет расшифровать структуру заболеваемости и прогнозировать появление новых возбудителей [Ефимочкина Н.Р., 2010].

1.4. Молекулярно – генетическая характеристика патогенного потенциала энтеробактерий

Рост числа ОКИ, вызванных условно - патогенными микроорганизмами (УПМ), многие исследователи связывают с изменением патогенности микроорганизмов, в том числе, на молекулярно-генетическом уровне [Булгаков А.К., Габидуллин З.Г., 2000; Воротынцева Н.В., 1985; Петровская В.Г., Бондаренко В.М., 1994].

Факт выделения УПЭ при острых кишечных инфекциях (ОКИ), как и их количественная оценка не всегда определяют способность изолята вызывать заболевание [Бондаренко В.М., 2011]. Для выявления этиологической значимости энтеробактерий при ОКИ необходимо заключение об их патогенном потенциале на молекулярно-генетическом уровне.

В основе изменения патогенности лежит структурная модификация ДНК, связанная с миграцией генетических детерминант «островов» патогенности между бактериями [Булгаков А.К., Габидуллин З.Г., 2000]. Особенности структурной организации этих мобильных генетических

элементов определяют высокую вероятность их экспрессии, а обнаружение нуклеотидных последовательностей ДНК, ассоциированных с генами «островов» патогенности может свидетельствовать об этнопатогенетической значимости клинического изолята.

Накопленные многочисленные данные об этнологической роли условно - патогенных *Enterobacteriaceae* при диарейных заболеваниях могут указывать на наличие у них дискретных генов патогенности. У патогенных вариантов гены патогенности сгруппированы в составе мобильных генетических элементов - «островов» патогенности, которые детерминируют ключевые этапы взаимодействия возбудителя с макроорганизмом, включая адгезию, продукцию токсинов, ферментов «агрессин» [Булгаков А.К., Габидуллин З.Г., 2000]. Обнаружение «островов» патогенности позволяет выявить группу энтеропатогенных бактерий, потенциально ответственных за развитие патологии в желудочно - кишечном тракте у детей [Жеребцова Н.Ю., 2006].

Клинические штаммы условно – патогенных микроорганизмов (представители родов *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Kluyvera*, *Morganella*, *Pantoea*, *Serratia* и *Providencia*), выделенные от детей с ОКИ, находящихся на лечении в Иркутской областной инфекционной клинической больнице, протестированы на наличие следующих генетических маркеров патогенности: *sfaA*, *sfaG* гены, ответственные за адгезию S типа, *fimA* ген — адгезия 1 типа, *hlyA*, *hlyB* — продукция гемолизинов, *irp-2* — синтез железорегулируемого белка. Выявлена генотипическая гетерогенность энтеробактерий по оцениваемым признакам. Нуклеотидные последовательности генов, кодирующих указанные факторы патогенности, обнаружены лишь у 23,4% штаммов. Наибольшая частота обнаружения была характерна для *hlyA* и *hlyB* генов (9,7% от всех протестированных штаммов и 60,9% от штаммов с наличием нуклеотидных последовательностей искомым генов). Среди генов, ассоциированных с адгезией, чаще обнаруживались маркеры *sfaA* и *sfaG*, а

частота встречаемости генетических детерминант адгезинов 1 типа (*fimA*) оказалась значимо ниже ($p < 0,05$). Наибольшую долю среди штаммов с наличием генетических детерминант патогенности составили *Klebsiella* spp. и *Citrobacter* spp. (39,0 и 24,4% соответственно). Самый широкий набор маркеров патогенности отмечен у штаммов *Klebsiella* spp. (*sfaA*, *sfaG*, *fimA*, *hlyB*, *hlyB*, *irp-2*). Выявлена связь между наличием генетических детерминант патогенности у выделенных от больных детей штаммов энтеробактерий и клиническими проявлениями, вызываемых ими инфекций (продолжительность и уровень лихорадки, а также длительность диареи). Полученные данные свидетельствуют о целесообразности определения генетических маркеров патогенности условно - патогенных энтеробактерий для выявления их этиологической значимости [Анганова Е.В., Савилов Е.Д., 2012].

Необходимо отметить, что в настоящее время для контроля за распространением антибиотикоустойчивости и профилактики внутрибольничных инфекций преимущественно используются методы серийных разведений, дискодиффузионный, Е-тест. Они отличаются трудоемкостью, продолжительностью и низкой воспроизводимостью, поскольку ориентированы на выявление фенотипических признаков. Указанное выше не позволяет использовать их для решения эпидемиологических задач. Кулуевым и его коллегами был проведен поиск нуклеотидных последовательностей генов *Enterobacteriaceae*, отвечающих за их антибиотикоустойчивость и подобраны соответствующие пары праймеры, характеризующиеся схожими температурами отжига, но разными размерами ампликонов для возможности в дальнейшем множественной ПЦР и одновременной детекции нескольких генов антибиотикоустойчивости. В качестве тестовых использовали 150 клинических штаммов условно-патогенных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus morganii* и *Escherichia coli*). В результате проведенных исследований нам удалось обнаружить 10

исследуемых генов, а именно гены *marA*, *marC*, гены устойчивости к аминогликозидам, сульфаниламидам, тетрациклину, фосфомицину, бацитрацину, эритромицину, триметоприму и блеомицину, тогда как гены устойчивости к тобрамицину, гентамицину, хлорамфениколу и альбицидину выявлены не были. У *Klebsiella pneumoniae* обнаруживаются гены устойчивости к антибиотикам (аминогликозидам, сульфаниламидам, фосфомицину, эритромицину, триметоприму, блеомицину) и два гена множественной антибиотикоустойчивости — *marA* и *marC*. Причем 4 штамма *Klebsiella pneumoniae* имели гены устойчивости к трем антибиотикам и 2 штамма к двум антибиотикам одновременно. У *Escherichiacoli* обнаруживались гены резистентности к 3 антибиотикам (сульфаниламидам, тетрациклину, бацитрацину), причем практически все анализируемые штаммы были резистентны к бацитрацину. Для *Proteus mirabilis* был характерен лишь ген устойчивости к эритромицину. Чаще всего резистентность среди условно - патогенных энтеробактерий наблюдалась к триметоприму, тетрациклину, бацитрацину, сульфаниламидам, фосфомицину. Реже встречалась устойчивость к блеомицину и эритромицину.

1.5. Этиологическая структура заболеваемости острыми кишечными инфекциями

В настоящее время вопрос об этиологической значимости условно-патогенных бактерий при возникновении острых кишечных заболеваний в нашей стране является спорным [Егорова С.А., Макарова М.А., Кафтыреева Л.А., 2011].

В последние годы достигнуты большие успехи в изучении особенностей патогенеза и клинических проявлений ОКИ [Воротынцева Н.В., 2001], однако этиологию кишечных инфекций при применении «традиционных» лабораторных методов исследования (бактериологического и серологического) удастся определить лишь у 1/3

больных. Так, в 2004 году заболеваемость ОКИ установленной этиологии составила 398,9 на 100 000 детей, из них у 212 на 100 000 выявлены шигеллез и сальмонеллез, а заболеваемость острыми кишечными инфекциями неустановленной этиологии составила 902,1 на 100 000. Это связано как с несовершенством лабораторных методов диагностики, так и с ростом удельного веса вирусных и паразитарных кишечных инфекций в структуре ОКИ, методы диагностики которых многим лабораториям практически недоступны [Новокшенов А.А., 2005].

Согласно существующим нормативным документам (МУ № 11-33/6-40, Москва, 1987), диагностика острых кишечных заболеваний, вызванных условно - патогенными энтеробактериями, включает идентификацию микроорганизма и количественную характеристику, выраженную в КОЕ/1,0 г испражнений. В то же время известно, что УПМ являются представителями факультативной микрофлоры толстого кишечника и достаточно часто обнаруживались в значительном количестве в испражнениях практически здоровых людей, не имеющих каких-либо нарушений со стороны желудочно-кишечного тракта [Егорова С.А., 2004; Леванова Л.А., Алешкин В.А., 2001 а; Леванова Л.А., Алешкин В.А., 2001 б].

Согласно современным представлениям о патогенности бактериальных возбудителей ОКЗ, они должны иметь определенный набор факторов патогенности, обеспечивающих выживание, размножение и развитие патологического процесса в желудочно – кишечном тракте человека. Энтеробактерии как возбудители ОКЗ могут содержать различные факторы патогенности: адгезии, инвазии, персистенции, токсины и токсические продукты, бактериальные модулины и другие [Бондаренко В.М., 1998].

Под патогенностью понимают способность возбудителей вызывать заболевания, которые определяются совокупным действием различных свойств или факторов патогенности возбудителя, обуславливающих

развитие в организме хозяина патологических изменений [Бондаренко В.М., 1999; Петровская В.Г., 1994]. Каждый из факторов патогенности ответственен за проявление конкретных свойств микроорганизма в инфекционном процессе [Коротяев А.И., Бабичев С.А., 1998]. Факторы патогенности подразделяют на четыре группы [Бондаренко В.М., 1999].

Первая группа факторов патогенности определяет взаимодействие бактерий с эпителием, соответствующих экологических ниш и колонизацию зоны первичного инфицирования. Процесс начинается с адгезии, основанной на избирательном взаимодействии бактерий с рецепторами эпителиоцитов с последующим размножением (колонизацией) микроорганизмов на поверхности слизистой. У большинства грамотрицательных бактерий адгезины собраны в поверхностные пили (*pili*, фимбрии) и завитки (*curli*) или ассоциированы с нефимбриальными адгезинами: полисахаридами капсул, липополисахаридами наружной клеточной стенки [Вартанян Ю.П., 1978., Burdette, 2000., Hedlund, 1998], липотейхоевыми кислотами или поверхностными белками.

Вторая группа обеспечивает устойчивость микробов к факторам защиты макроорганизма и способность к размножению *in vivo* [Бондаренко В.М., 1999]. В целях сохранения возбудителя, находящегося в организме, от бактерицидных факторов сыворотки или фагоцитов микробная клетка располагает средствами дистанционного действия, которые представляют многочисленную группу секретируемых бактериальных субстанций, направленных на инактивацию механизмов иммунитета организма. У энтеробактерий это О, К и Vi – антигены, белки наружной мембраны, в частности, у *Klebsiella* spp. это полисахаридная капсула и мукоид, липополисахарид (ЛПС), IgA-протеазы, вещества, инактивирующие лизоцим и бактерицидный компонент интерферона, гемолизины [Finlay, 1999].

К третьей группе относят бактериальные факторы или модулины, индуцирующие синтез цитокинов (ЦТ) и медиаторов воспаления [Бондаренко В.М., 1999]. Модулинами являются ЛПС, липид А, липид А ассоциированный белок, другие поверхностные белки, пили, порины, токсины и ферменты [Harrisonetal., 2004; Wilson, 1998]. Обнаружено, что даже непосредственное связывание возбудителя с кишечным эпителием вызывает выработку эпителиоцитами провоспалительных ЦТ [Wilsonetal., 1998] – «контактная болезнетворность» [Маянский А.Н.,2004.].

Четвертую группу составляют токсины и токсические продукты, оказывающие повреждающее действие на различные органы и ткани организма хозяина [Бондаренко В.М., 1999]. Токсины, обнаруженные у представителей семейства *Enterobacteriaceae*, подразделяют на четыре класса [Searsetal., 1996]:

1 – энтеротоксины – влияют на ионную секрецию энтероцитов, не повреждая их (цитотонины) [Петровская В.Г., Бондаренко В.М., 1990];

2 – токсины, нарушающие цитоскелет эпителиальных клеток, путем реорганизации нитей F-актина: цитолетальный расширяющий токсин, цитотоксический некротизирующий фактор;

3 – цитотоксины, вызывающие гибель клеток: гемолизины, шига и шига-подобные токсины, цитолетальный расширяющий токсин, цитотоксический некротизирующий фактор;

4 – токсины, влияющие на нервную систему кишечника, в результате освобождения одного или несколько нейротрансмиттеров и нарушения активности гладкой мускулатуры: термостабильный энтеротоксин а.

Под токсинами в настоящее время понимают любые «регуляторные элементы, действующие в гетерологичных клеточных системах вне их контроля и сдвигающие равновесие протекающих в них физиологических процессов» Особенностью бактериальных токсинов является связь токсинов с другими биологически активными веществами. Токсины

некоторыми участками своих молекул имитируют структуру субъединиц ферментов, гормонов, что обеспечивает микробным токсинам способность вмешиваться в различные обменные процессы у организмов, весьма отдалённых друг от друга по филогенетической лестнице [Вертиев Ю.В., 1996].

Термостабильные энтеротоксины (ST-токсины) и транзистентные пороформирующие токсины (RTX), продуцируемые УПМ, представляют собой гетерогенную совокупность бактериальных белков, связывающихся с поверхностными молекулами клетки-хозяина и/или формирующих поры в её цитоплазматической мембране.

ST-токсины УПЭ - большая группа функционально активных белков, оказывающих токсический эффект на желудочно-кишечный тракт человека, обуславливающих диарейный симптомокомплекс на фоне выраженной общей интоксикации организма [Sears C.L., 1996]. При вспышках заболеваний, связываемых с ST-токсинами УПЭ, обнаруживаются *Escherichia coli* сероваров 06, 08, 015, 020, 025, 027, 063, 078, 080, 085, 0115, 0128ac, 0139, 0148, 0153, 0159, 0167 (Levine, 1987), *Citrobacter freundii* (Guarino, 1987), *Yersinia enterocolitica* сероваров O1; O1,2a,3; O2a,2b,3; O3; O5,27; O9; O4; O8;O13a,13b; O18; O20 и O21, *Yersinia kristensenii* сероваров O11 и O12 (Delor, 1990). Не исключается продукция ST-токсинов *Morganella morganii* (Bornsid, 1986) и *Klebsiella spp* [Шмитт и др., 2000).

Наиболее изучены ST-токсины *Escherichia coli*, дифференцируемые как STa и STb [Okamoto et al., 1993].

В основе действия STa лежит замещение им эндогенного лиганда GC-C гормоноида гуанилина (Kuhn et al., 1994). Физиологическое значение самого гуанилина заключается в поддержании гомеостаза кишечника, тогда как конкурентное «вклинивание» в этот процесс STa обуславливает нарушение транспорта ионов. Активация GC-C повышает уровень внутриклеточного цГМФ, что определяет стимуляцию секреции хлоридов

и/или ингибирует абсорбцию NaCl, обуславливая потерю жидкости кишечником. Основу указанного составляет активация линейных каналов хлоридов, известных как регуляторы трансмембранной проводимости (CFTR), что связывается с активацией протеинкиназы А. Считается, что описанные механизмы объясняют природу нарушений процессов абсорбции при STa-обусловленных формах патологии человека. Ген термостабильного энтеротоксина *estB* расположен на гетерогенных плазмидах, которые одновременно могут детерминировать другие энтеротоксины, колонизационный фактор, лекарственную устойчивость, продукцию колицинов.

Транзиентные пороформирующие токсины представлены достаточно большой группой белков, именуемых RTX токсинами (по имеющимся в них повторам «repeats in toxin»). Она объединяет цитолизины, металлопротеазы и липазы, обнаруженные у большинства грамотрицательных бактерий.

В зависимости от клеток-мишеней RTX-токсины подразделяют на 2 категории: RTX-гемолизины, токсичные для клеток разных типов, включая эритроциты и фибробласты, и RTX-лейкотоксины, спектр эффекта которых носит видоспецифический характер [Lally N.E., 1999].

Среди УПЭ RTX-токсины обнаружены у *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Morganella* spp. Классическим примером может служить гемолизин *Escherichia coli* со свойствами протоксина (α -Hly), активация которого приводит к формированию нестабильных пор диаметром 2-3 нм. Через них в дальнейшем осуществляется катионспецифичный транспорт и осмотический лизис клетки.

А/В-токсины – это большая группа токсинов, часто генетически детерминируемых профагом. У них дифференцируют две функционально значимые субъединицы А и В. Собственно токсический эффект оказывает обладающая ферментативной активностью субъединица А, которая действует внутриклеточно. Трансмембранный же её транспорт

осуществляется благодаря конформационным изменениям субъединицы А, инициируемым субъединицей В [Merrit E.A., 1995].

Среди токсинов этой группы у представителей семейства *Enterobacteriaceae* обнаруживаются:

- Шига-токсин (Stx) – у *Shigella dysenteriae* и веротоксин у энтерогеморрагических *Escherichia coli*;
- Термолабильные энтеротоксины энтеротоксигенных *Escherichia coli*;
- Цитолетальные токсины *Shigella* spp., *Escherichia coli*;
- Цитотоксический некротизирующий фактор (CNF) *Escherichia coli*.

Stx-токсины *Escherichia coli* дифференцируют на 2 группы: Stx1 и Stx2, обладающие гомологией порядка 50-60%, но различающиеся по антигенному строению. Они неидентичны по рецепторной специфичности и способности активироваться под воздействием слизи кишечника, что связывают с отличиями в 1-2 нуклеотида в соответствующих генах [O'Brien et al., 1998].

Гены, детерминирующие Stx1 и Stx2 *Escherichia coli*, входят в состав генома умеренного бактериофага, который объединяет генетические детерминанты каждой из субъединиц (stxA и stxB). Оперон Stx1 одновременно содержит железорегулируемую область, контролирующую уровень экспрессии токсина. Механизмы регуляции Stx2 не установлены, но известно положительное влияние на активность этого токсина компонентов интестинальной слизи. Токсины этой группы не способны активно выделяться бактериальной клеткой; полагают, что их высвобождение происходит в процессе её лизиса (Endo et al., 1998).

Шига-подобные токсины (SLT) или веротоксины обнаружены у *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* [Paton J.C., 1996]. Шига-продуцирующие энтеробактерии вызывают различные клинические проявления: диарея, геморрагический колит, часто осложняющийся

гемолитико-уремическим синдромом. Шига-токсину, продуцируемому *Shigella dysenteriae*, полностью идентичен SLT-I. Каждый из токсинов состоит из А и В субъединиц. Субъединица В связывает мембранный гликолипид – Gb₃. Субъединица А эндоцитозом проникает в клетку, транспортируется в эндоплазматический ретикулум и, обладая N-гликозидазной активностью, отщепляет аденин от 28S-rРНК, блокируя синтез белка. В патогенез диареи шига-токсины вносят вклад через снижение абсорбции NaCl, посредством селективного повреждения абсорбирующих ворсин. Эпителий ворсин содержит больше Gb₃, чем эпителий крипт, вследствие чего ворсины более чувствительны к SLT. Одновременно SLT вызывает повреждение сосудов, подслизистый отек, стимулирует локальную секрецию интерлейкина-1, интерлейкина-8 и фактора активации тромбоцитов, что приводит к инфильтрации слизистой нейтрофилами, которая может играть ключевую роль в патогенезе диареи [Harrison L.M., 2004].

Энтеротоксины — это термолабильные или термостабильные вещества, воздействующие на биохимические функции молодых эпителиоцитов крипт без видимых морфологических изменений. Они наиболее активны в проксимальном отделе тонкой кишки. Энтеротоксины усиливают активность, содержащихся в мембранах кишечного эпителия, аденилатциклазы и гуанилатциклазы. При их участии и посредством стимулирующего действия простагландинов увеличивается образование циклического аденозинмонофосфата. В результате в просвет кишки секретируется большое количество бедной белком, но содержащей электролиты жидкости, которая не успевает реабсорбироваться в толстой кишке. Как следствие — развивается водянистая диарея [Лобзин Ю.В., 2000].

Термолабильный энтеротоксин (LT) является одним из ключевых факторов патогенности условно-патогенных энтеробактерий, эффект действия которого клинически проявляется диарейным синдромом [Sears

et al., 1996]. Среди термолабильных энтеротоксинов *Escherichia coli* иммунологически дифференцируют LT I и LT II, при этом в патологии человека значим преимущественно LT I. Молекулярный механизм патогенного потенциала термолабильного энтеротоксина обусловлен сложной его структурой, характеризующиеся наличием «А» и «В» фрагментов [Jobling et al., 2002]. Субъединица А, состоящая из 2 пептидов А1 и А2, связанных дисульфидной связью, ответственна за токсичность, субъединица В не токсична и обеспечивает прикрепление молекулы токсина к специфическим клеточным рецепторам [Yamamoto et al., 1982]. Прикрепление молекулы голотоксина к клеткам эпителия, осуществляется за счёт связывания субъединицы В с рецепторами, сопровождающееся образованием канала, через который субъединица А проникает в клетку сквозь мембрану. Под действием последней увеличивается внутриклеточный уровень аденилатциклазы, снижается концентрация калия и происходит выделение хлористого натрия, что ведёт к потере клетками жидкости, развивается диарея. Значение LT II в патологии человека и животных не показано даже, несмотря на достаточно высокий уровень гомологии с А-субъединицей LT I *Escherichia coli* и холерного токсина [Fukuta et al., 1988].

В 1987 году были описаны цитолетальные «вспенивающие» токсины (cytolethal distending toxins (CDT)). Структура их детально не охарактеризована. В настоящее время установлен белковый продукт одного (*cdtC*) из трех генов (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*), с наличием которых связывают продукцию указанных токсинов. Это белок размером порядка 20 кДа. Эффект CDT на культуре клеток проявляется в 4-5 кратном увеличении пораженных клеток с последующей гибелью. Этому предшествует их округление, вспенивание мембраны и фрагментация ядерного материала. CDT по последним данным представляют семейство токсинов, обнаруженных среди УПЭ у штаммов *Shigella* spp. и некоторых вариантов *Escherichia coli*. Основу их действия связывают с блокадой фазы

G2 клеточного цикла, что нарушает процесс пролиферации. Различные типы указанных токсинов дифференцируются по клеткам-мишеням.

Цитотоксический некротизирующий фактор (CNF) *Escherichia coli* - одноцепочечный, мультидоменный белок с карбокситерминальной деамидазной активностью и выраженными гидрофильными свойствами (мол. масса 115 кДа). Он имеет два основных домена: связывающий и ферментативный.

Токсический эффект CNF связан с активирующим модифицированием Rho-подсемейства небольших ГТФ-связывающих белков, которые регулируют образование бактериального цитоскелета из актина [Aktories et al., 1997]. Это показано для CNF1 и CNF2 *E. coli*, дермонекротического токсина *Bordetella* spp., но отличает их от остальных токсинов этого семейства, продуцируемых, например, *Clostridium botulinum* [Flatau et al., 1997; Schmidt et al., 1997].

Функциональные различия CNF1 и CNF2 *Escherichia coli* не согласуются с уровнем гомологии этих биомолекул, достигающим 99%, но конечным результатом их воздействия являются фокальная адгезия, сокращение волокон актина и последующая складчатость цитоплазматической мембраны клетки-хозяина. Это, в сумме с токсин-индуцированной репликацией ДНК без сопутствующего деления клетки, обуславливает образование симпластов. *In vivo* при внутрикожном введении кроликам и мышам CNF наблюдается некроз и персистентное воспаление [DeRycke et al., 1990].

Некоторые энтеропатогенные культуры *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei* [Clarke et al., 2003] и, возможно, другие УПЭ [Бондаренко В.М., 1999] проявляют АЕ-активность, подобно ЕРЕС и энтерогеморрагическим *Escherichia coli* (ЕНЕС) [Nataro et al., 1998], что определяет иной тип взаимодействия возбудителей ОКИ с кишечным эпителием. АЕ-активность – это разновидность адгезии бактерий, получившей название механизма «прикрепления – сглаживания» (от англ.

«attaching-effacing»). Данный патологический процесс контролируется «островком» патогенности, названным «локус сглаживания энтероцита» – LEE [Chen et al., 2005; Sonnenberg et al., 2001; Clarke et al., 2003]. В проявлении АЕ-активности участвует плаزمид EAF – «*Escherichia coli* прикрепляющий фактор» [Nataro et al., 1998]. LEE включает в себя следующие гены: *eae* – кодирующий адгезин-интимин, фенотипически проявляющийся АЕ повреждением, *esp* – секреторные белки, *esc* – III тип секреции, *ler* – регулятор проявления LEE, *tir* – рецептор для транслокации интимина, который инициирует реорганизацию актина, *map* – митохондрия, нарушающая мембранную целостность, участвует в образовании возвышения, *ser* – проводитель для некоторых генов [Newman et al., 1999; Hartland et al., 2000]. В проявлении АЕ-активности участвует плазмид EAF – «*Escherichia coli* прикрепляющий фактор». В начальной стадии прикрепление бактерий к энтероцитам осуществляется через плазмидопосредованные пучок формирующие пили А – *bfpA* и поверхностно ассоциированные филаменты – *espA*. После адгезии возбудителя включается III тип секреции, посредством которого в энтероцит поступает транслокационный интимин рецептор и эффекторные белки. Последние вызывают нарушение цитоскелета, сдувание микроворсинок и деполимеризацию актина. Рецептор для интимина видоизменяется под воздействием протеинкиназы А и тирозин - протеинкиназы и вклинивается в клеточную мембрану. Адгезин - интимин соединяется с рецептором, аккумулирует F актин и другие элементы цитоскелета под областью прикрепления бактерии, в результате этого эпителиальная мембрана локально повышается в характерный пьедестал, который может выступать до 10 мкм, формируя очертания ложноножки. Развивается осмотическая диарея. Однако, учитывая очень короткий инкубационный период в эксперименте – менее 3 часов, наиболее вероятно вовлечение в патогенез диареи секреторных механизмов [Nataro et al., 1998].

Официально признанные патогенные энтеробактерии (*Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*) имеют специфические факторы патогенности, определяющие патогенез ОКЗ. Так, *Shigella* и энтероинвазивные *Escherichia coli* (ЭИКП) обладают способностью к внутриклеточной инвазии, энтеропатогенные *Escherichia coli* (ЭИКП) вызывают изменение цитоскелета и слущивание кишечного эпителия, энтеротоксигенные *Escherichia coli* (ЭТКП) продуцируют энтеротоксины, энтерогеморрагические *Escherichia coli* (ЭГКП) способны к продукции шига-подобных токсинов [Caprioli, 2005].

Несмотря на разнообразие бактериальных агентов, способных вызвать острую кишечную инфекцию (ОКИ) у ребенка, в большинстве случаев этиология заболевания остается не выявленной. Это связано, как с изменением культуральных свойств возбудителей, так и бесконтрольным приемом лекарственных препаратов в ранние сроки заболевания.

Этиология диарей у грудных детей обусловлена неустойчивым микробиоценозом кишечного тракта, особенностями иммунной системы. [Немченко У.М., 2011]. Одним из факторов, который действует на свойства микроорганизмов является геомагнитное поле (ГМП) повышенной напряженности, регистрируемое в г. Железногорске, расположенном на территории Курской магнитной аномалии.

Для сравнения был проведен анализ структуры заболеваемости ОКИ в г. Курске (регион с фоновыми значениями ГМП). В обоих регионах преобладают острые кишечные инфекции невыясненной этиологии: они составляют 69% всех ОКИ в Курске и 70% в Железногорске. Второй по частоте инфекцией в г. Курске можно назвать шигеллез (28%), и только 3% всех случаев ОКИ вызваны сальмонеллами. В г. Железногорске шигеллез также находится на втором месте, однако роль сальмонеллезной инфекции в этиологической структуре ОКИ там гораздо выше. На сальмонеллез приходится около 10% случаев всех кишечных инфекций в данном

регионе. Наиболее часто острые кишечные инфекции встречаются в раннем детском возрасте.

Заболеваемость ОКИ в этой возрастной группе значительно выше, чем среди старших детей. Причем заболеваемость ОКИ среди детей раннего возраста превышает показатели общей детской заболеваемости в г. Курске в 4,4 раза, в г. Железногорске — в 2,9 раза, а по Курской области в — 3,4 раза.

При анализе возрастной структуры заболеваемости сальмонеллезом в Курской области и исследуемых регионах также выявлено преобладание количества заболевших среди детей раннего возраста. Шигеллез в обоих регионах встречался в основном у детей 1–3 лет. Однако, в регионе с повышенными значениями геомагнитного поля заболеваемость шигеллезом в младшей возрастной группе превышала общую заболеваемость у детей в 1,4 раза, а в г. Курске — в 2,5 раза. Таким образом, при анализе динамики, характера и структуры заболеваемости ОКИ в г. Курске, г. Железногорске и в Курской области выявлены значительно более высокие ее значения в регионе с аномальными значениями напряженности ГМП Земли.

Условно - патогенные бактерии семейства *Enteobacteriaceae* характеризуются выраженной фенотипической и генотипической гетерогенностью, что необходимо учитывать при оценке этиологической и эпидемиологической значимости [Анганова Е.И., 2012].

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Сбор коллекции клинических штаммов

Для сбора коллекции клинических штаммов УПЭ исследовали клинический материал, полученный от больных, а именно испражнения.

Выделение чистой культуры микроорганизмов осуществляли по общепринятой методике, с использованием отечественных питательных сред. Посевы инкубировали при 37°C в течение суток, и при необходимости – дополнительно при комнатной температуре. Подозрительные колонии дифференцировали макроскопически по морфологии и микроскопически – после окраски препаратов по методу Грама.

В целом из клинического материала культуральным методом было выделено и исследовано 1 штаммов условно-патогенных энтеробактерий, преимущественно отнесенных в результате биохимической идентификации к видам *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus morganii*, *Shigella flexneri*, а так же патогенных энтеробактерий и других.

2.2. Выделение бактериальной ДНК

Тотальную бактериальную ДНК выделяли из суточной агаровой культуры, используя стандартные наборы для выделения ДНК («ДНК-сорб-АМ», Россия). Этот метод основан на сорбции ДНК на частичках силикогеля (SiO_2) в присутствии 4-6 М гуанидинтиоционата. Лизирующим агентом в данном случае служит TritonX100, содержащийся в лизирующем буфере в концентрации 0,5-1%. В свою очередь гуанидинтиоционат 4-6 М концентрации за счет своих хаотропных свойств также способствует лизированию клеток. В дальнейшем при добавлении суспензии силикогеля на их частицах происходит сорбция нуклеиновых кислот (НК). При центрифугировании комплекс $\text{SiO}_2 + \text{НК}$ уходит в осадок, а надосадочную

жидкость, содержащую все остальные компоненты клеток становится возможным удалить. Для избавления от остатка гуанидинтиоционата осадок промывали 70% этиловым спиртом, в присутствии которого комплекс $\text{SiO}_2 + \text{НК}$ не разрушается и при центрифугировании также уходит в осадок. Надосадочная жидкость также удаляется. При добавлении к комплексу воды, НК переходят в растворимую форму, тем самым освобождаясь от частичек силикогеля. Для лучшего перехода НК в раствор суспензию комплекса в воде прогревали до 65°C . В ходе работы отбирали необходимое количество одноразовых пробирок. В них добавляли по 300 мкл лизирующего раствора (5М гуанидинтиоционат, 1% TritonX100). Далее маркировали пробирки. В пробирки с лизирующим раствором вносили необходимое количество клеток исследуемых микроорганизмов. Пробы тщательно перемешивали на вортексе и прогревали 5 минут при температуре 65°C . Центрифугировали 5 секунд при 5 тыс. об/мин на микроцентрифуге. Когда проба растворялась не полностью, пробирку центрифугировали на микроцентрифуге 5 минут при 12 тыс. об/мин и использовали для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенесли ее в новую пробирку. В каждую пробирку отдельным наконечником добавляли по 25 мкл ресуспендированного сорбента (силикагель) и перемешивали на вортексе. Затем пробирки ставили в штатив на 2 минуты, еще раз перемешивали и оставляли в штативе на 5 минут. Далее осаждали сорбент в пробирках центрифугированием при 5 тыс. об/мин в течение 30 секунд. Потом удаляли надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. В пробы добавляли по 300 мкл раствора для отмывки (5М гуанидинтиоционат), перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Сорбент осаждали центрифугированием при 5 тыс. об/мин на микроцентрифуге в течение 30 секунд. Надосадочную жидкость удаляли, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы, и добавляли в неё по 950 мкл раствора для отмывки (70% этиловый

спирт). Перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировали 30 секунд при 10 тыс. об/мин на микроцентрифуге. Надосадочную жидкость удаляли также, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Пробирки помещали в термостат при температуре 65°C на 5-10 минут для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок были открыты. В пробирки добавляли по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК и перемешивали на вортексе. В термостат помещали при температуре 65°C на 5 минут, периодически встряхивая на вортексе. Центрифугировали пробирки при 12 тыс. об/мин в течение 1 минуту на микроцентрифуге. В итоге получили надосадочную жидкость, содержащую очищенную ДНК, готовую к постановке ПЦР.

2.3. Амплификация участков ДНК геномов микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции

В основе метода ПЦР (полимеразной цепной реакции) лежит способность хорошо известных в молекулярной биологии ферментов, ДНК-полимераз, осуществлять направленный синтез второй, т.е. комплементарной цепи ДНК, по имеющейся матрице одноцепочечной ДНК, наращивая небольшую олигонуклеотидную затравку (праймер), комплементарную участку этой матрицы, до размеров в несколько тысяч или даже десятков тысяч звеньев. Каждый цикл ПЦР состоит из трех этапов. На первом этапе необходимо денатурировать ДНК, находящуюся в образце. Для этого реакционную смесь нагревают до 92 - 95°C, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул. На втором этапе происходит отжиг (присоединение праймеров к ДНК-мишени с образованием коротких двухцепочечных участков ДНК, необходимых для инициации синтеза ДНК). С образовавшимися комплексами праймер - матрица связывается ДНК-полимераза и на третьем этапе происходит одновременное

копирование ДНК с двух праймеров комплементарных участкам ДНК на противоположных цепях и расположенных таким образом, что полимеризация ДНК с одного праймера приводила к синтезу цепи ДНК, в которой на определенном удалении содержался участок ДНК, комплементарный другому праймеру. Двунитевые фрагменты ДНК, равные по длине расстоянию между двумя праймерами, начинают накапливаться после третьего цикла. Принципиально, что синтезированные в ходе первого цикла ПЦР цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента нуклеиновой кислоты генома вируса, бактерий или человека. В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза все новых и новых цепей.

Имеется также возможность использования сразу нескольких пар видоспецифических праймеров в одной реакционной пробирке для одновременной амплификации ДНК различных возбудителей. Такая модификация получила название множественной ПЦР (*multiplexPCR*).

Множественная ПЦР может быть использована для выявления этиологической роли различных микроорганизмов, вызывающих заболевания определенного типа. Так, например, описаны варианты применения множественной ПЦР для одновременного обнаружения двух (*Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae* при заболеваниях урогенитального тракта) [Crotchfelt et al., 1997] или даже трех возбудителей (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* при хроническом гнойном отите) [Hendolin et al., 1997].

Для избирательной амплификации *in vitro* определенных участков ДНК был использован метод ПЦР. Объем реакционных смесей для полимеразной цепной реакции (ПЦР) варьировал от 20 до 100 мкл в зависимости от целей эксперимента. Для аналитической ПЦР использовался объем реакционной смеси 30 мкл. В этом случае реакционная смесь объемом 30 мкл содержала 1 мкл геномной ДНК (100

нг/мкл), 3 мкл 10-кратного буфера для Taq – полимеразы, поставляемого в наборе с используемым ферментом, по 3 мкл dNTP, 1мкл каждого праймера и 1 мкл Taq–полимеразы.

Во избежание испарения жидкости на поверхность каждой реакционной смеси наслаивали 50 мкл минерального масла. ПЦР проводилась в амплификаторе МС–16 «Терцик» («ДНК-технология», Россия). На начальном этапе проводилась денатурация ДНК при 94°C, после чего следовали 25 - 30 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации ДНК в течение 40 секунд при 94°C, стадию отжига праймеров продолжительностью 1 минута 30 секунд при температуре от 54 до 72°C (в зависимости от длины и нуклеотидных последовательностей использованных праймеров), и стадию элонгации в течение 1 мин 30 сек при температуре 72°C, оптимальной для Taq–полимеразы. В некоторых случаях для оптимизации ПЦР и уменьшения количества неспецифичных продуктов амплификации использовался «горячий старт». По этой процедуре попадание Taq–полимеразы, разбавленной в 10мкл соответствующего 1-кратного буфера, в реакционную смесь осуществлялось только после нагрева последней до 94°C, что исключало возможность неспецифичного отжига праймеров на нуклеотидных последовательностях с низкой гомологией.

Качество и количество амплифицированных фрагментов ДНК определяли аналитическим электрофорезом в 1% агарозном геле. После окончания электрофореза гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали на фотодокументационной системе GelCameraSystem (UVP, Inc.США). Для подбора праймеров был использован ресурс Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) и программа PrimerSelect из пакета программ DNASTar.

2.4. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле

Добавляли рассчитанное количество порошка агарозы (1 грамм) в отмеренный объем электрофоретического буфера (2мл 50x TAE буфера и

100мл очищенной воды). Нагревали смесь в микроволновой печи до полного расплавления гели (2-2,5 мин). Раствор остужали до 50°C.

В заливочную камеру помещали чисто вымытую стеклянную пластинку. Края камеры обрабатывали остывающей агарозой во избежание дальнейшего вытекания агарозы из камеры. На одном из краев камеры установили пластиковый гребешок так, что его зубцы образовали в геле лунки для проб ДНК. Необходимо, чтобы между концом зубчиков и стеклянной пластинкой оставался зазор 0,3 - 0,5 см. Аккуратно заливали в форму теплый раствор агарозы толщиной не более 5 – 6 мм. Приготавливали 1 л 1-кратного буфера ТАЕ. После полного затвердения агарозы (15-20 мин) аккуратно вынимали гребенку, стараясь не повредить образовавшиеся кармашки. Пластинку с гелем из камеры помещали в электрофоретическую камеру. Заливали в камеру буфер так, что он покрыл агарозу сверху тонким слоем 2-3 мм.

Отбирали 15 мкл раствора ДНК из эппендорфа на пластинку для нанесения проб. Добавляли 3 мкл красителя бромфенолового синего с ксиленцианолом и глицерином. Перемешивали пипеткой. Медленно наносили автоматической пипеткой пробу ДНК с красителем в лунку геля под слой буфера. Подключали клеммы прибора к источнику питания так, чтобы (-) находился на старте, а (+) – на финише. Включали источник питания и устанавливали напряжение в 100 вольт. Проводили разделение ДНК в течение 30 - 40 минут. Вынимали пластинку с гелем и помещали ее в кювету для окрашивания. Наливали в кювету слабый раствор бромистого этидия. Окрашивали в течение 10-15 минут. Сливали краситель в колбу. Промывали гель проточной водой. Помещали его на стекло трансиллюминатора. Фотографировали гель на фотосистеме Gel Camera System (UVP, Inc.США).

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Анализ представленности патогенных и условно-патогенных *Enterobacteriaceae* в исследуемом клиническом материале

Проведено клинико – лабораторное обследование 61 больных острой кишечной инфекцией различной этиологии. В качестве клинического материала для молекулярно – генетического исследования были использованы испражнения больных. Было выделено и исследовано 61 образец тотальной ДНК.

Далее с помощью пары праймеров мы определили возможный видовой состав семейства *Enterobacteriaceae* в исследуемых клинических образцах.

Для идентификации видового состава энтеробактерий методом ПЦР – анализа мы использовали подобранные нами ранее пары праймеров к видоспецифичным участкам ДНК.

Для амплификации *Klebsiella pneumoniae* использовались пары праймеров следующей структуры: KlebFgggaccttcgggcctcatgccatcaga и KlebRtctcacagttcccgaaggcaccaa. Расчетная температура отжига составила 60⁰С, размер ампликона 843 п.н. Специфичный ампликон *Klebsiella pneumoniae* был выявлен в 30 образцах под номерами: 4, 6, 18, 40, 41, 46, 65, 66, 68, 78, 103, 112, 120, 122, 129, 133, 142, 152, 176, 178, 183, 221, 222, 224, 230, 89, 93, 101, 128, 152.

Электрофореграмма результата ПЦР участка ДНК *K.pneumoniae* представлена на рисунке 1.

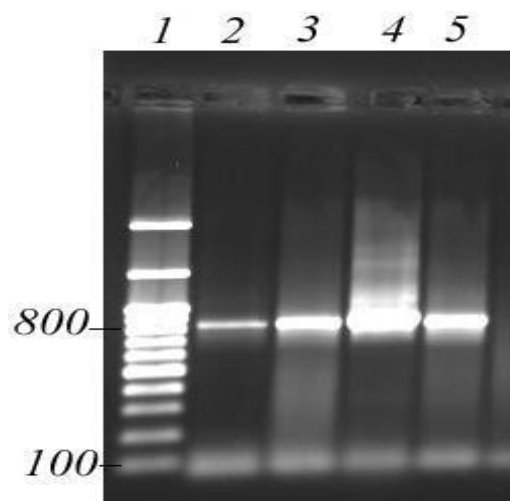


Рис. 1. Электрофореграмма результата ПЦР уникального участка ДНК *K. pneumoniae*. 1- маркер молекулярного веса. 2-5 – ампликоны размером 843 п.н.

Для амплификации *Escherichia coli* использовались пары праймеров следующей структуры: ColEFagctaataccgcataacgtcgcaagacsaagagg и ColERtctcacgggtcccggaaggcacattctcatct. Температура отжига 62⁰С, размер ампликона 571 п.н. В результате ПЦР – анализа было показано, что ампликон *E. coli* встречается в 8 клинических образцах под номерами: 68, 99, 118, 141, 198, 218, 220, 225.

Электрофореграмма результатов ПЦР участка ДНК *E. coli* представлена на рисунке 2.

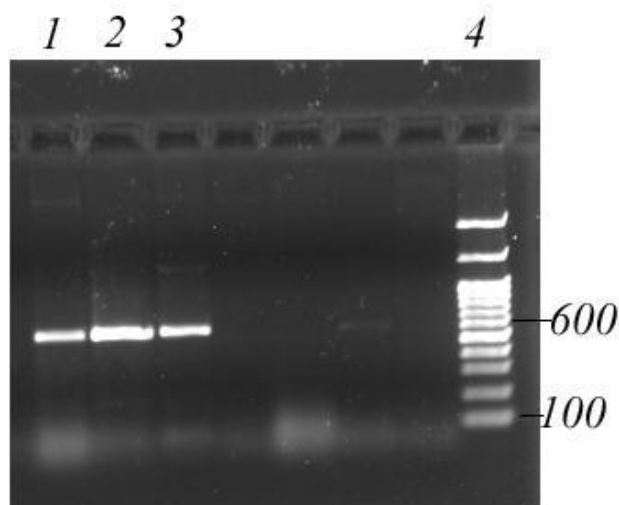


Рис. 2. Электрофореграмма результатов ПЦР уникального участка ДНК *E. coli*. 1-3 – ампликоны размером 571 п.н. 4 – маркер молекулярного веса.

Для ПЦР – анализа *Proteus morganii* были использованы пары праймеров следующей структуры: ProtFggcgccccctggacaaagac и ProtRtctcagcgttcccgaaggcactcct. Температура отжига 60⁰С, размер ампликона 315 п.н. *P. morganii* был обнаружен в 1 клиническом образце под номером 36.

Электрофореграмма результата ПЦР участка ДНК *P. morganii* размером 315 п.н. представлена на рисунке 3.

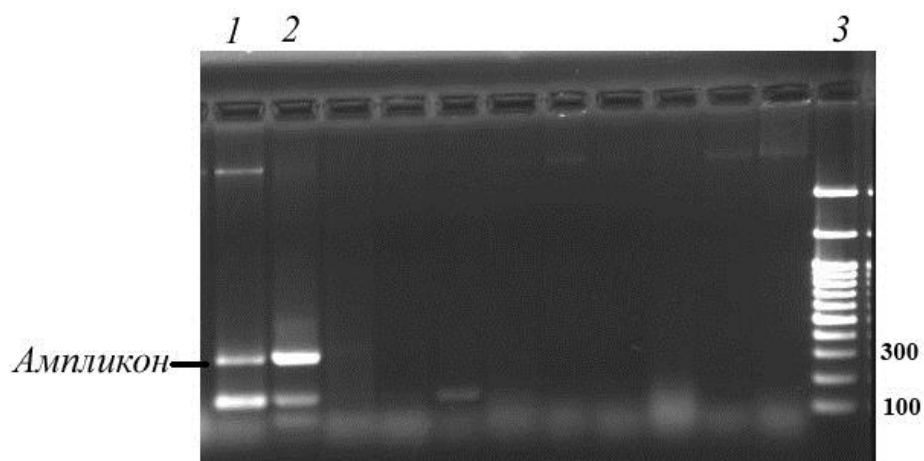


Рис. 3. Электрофореграмма результата ПЦР участка ДНК *P. morganii* размером 315 п.н. 1 и 2 – ампликоны *P. morganii*. 3 – маркерная молекула ДНК.

Для амплификации *Hafnia alvei* были использованы следующие пары праймеров: HafFaaggccttcgggttgtaaa и HafRagttcccgaaggcactaag. Температура отжига 57⁰С, а размер ампликона- 625 п.н. Выявлен в 19 образцах под номерами: 1, 21, 34, 128, 132, 174, 181, 186, 190, 219, 223, 227, 228, 229, 1, 46, 97, 113, 137.

Электрофореграмма результата ПЦР участка ДНК *H. alvei* представлена на рисунке 4.

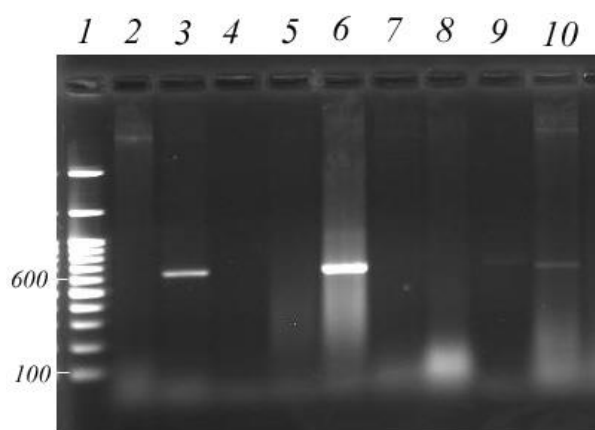


Рис. 4. Электрофореграмма результата ПЦР уникального участка ДНК *H. alvei*. 1- маркер молекулярного веса. 2-10 – ампликоны размером 625 п.н.

Пары праймеров для *Citrobacter freundii*: CitroFttgtgggtaataaccgcagca и CitroRacagttcccgaaggcaccctc. Температура отжига 57,9⁰С, размер ампликона 584 п.н. *C. freundii* обнаружен в 8 клинических образцах под номерами: 2, 4, 15, 36, 210, 224, 226, 230.

Электрофореграмма результатов амплификации участка ДНК *C. freundii* размером 584 п.н. представлена на рисунке 5.

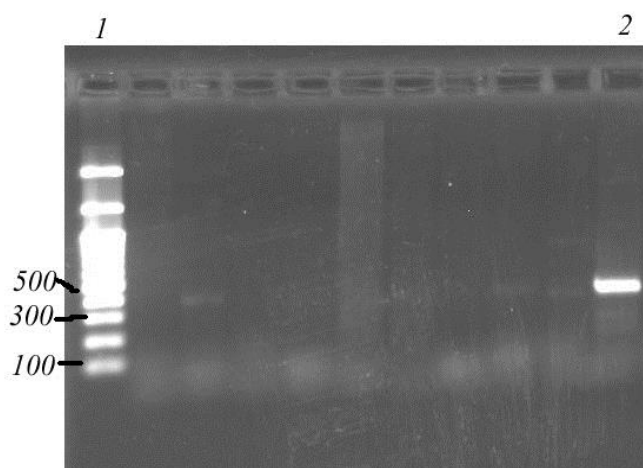


Рис. 5. Электрофореграмма результатов амплификации ДНК *C. freundii* размером 584 п.н. 1 – маркер молекулярного веса. 2 – специфичный ампликон *C. freundii*.

Результаты встречаемости представлены в таблице 1.

Таблица 1. Встречаемость *Enterobacteriaceae* и *Staphylococcus aureus* в клинических образцах методом ПЦР.

№ клинического образца	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Prorues morganii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Shigella flexneri</i>
1	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	-	-	-	-	-
4	-	+	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	+	-	-	-
18	-	+	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	+	-	-	-	-	-	-
34	-	-	+	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	+	-	-	-	-
40	-	+	-	-	-	-	-	-	-
41	-	+	-	-	-	-	-	-	-
46	-	+	-	-	-	-	-	-	-
65	-	+	-	-	-	-	-	-	-
66	-	+	-	-	-	-	-	-	-
68	+	-	-	-	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-	-	-	+
99	+	-	-	-	-	-	-	-	-
103	-	+	-	-	-	-	-	-	-
112	+	-	-	-	-	-	-	-	-
118	+	-	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	+
122	-	+	-	-	-	-	-	-	-
128	-	-	+	-	-	-	-	-	-
129	-	+	-	-	-	-	-	-	-
132	-	-	+	-	-	-	-	-	-
133	-	+	-	-	-	-	-	-	-
141	+	-	-	-	-	-	-	-	-
142	-	+	-	-	-	-	-	-	-
152	-	+	-	-	-	-	-	-	-

№ клинического образца	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Prorues morganii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Shigella flexneri</i>
174	-	-	+	-	-	-	-	-	-
176	-	+	-	-	-	-	-	-	-
178	-	+	-	-	-	-	-	-	-
181	-	-	+	-	-	-	-	-	-
183	-	+	-	-	-	-	-	-	-
186	-	-	+	-	-	-	-	-	-
190	-	-	-	-	-	-	-	-	+
198	+	-	-	-	-	-	-	-	-
210	-	-	-	-	-	+	-	-	-
218	+	-	-	-	-	-	-	-	-
219	-	-	+	-	-	-	-	-	-
220	+	-	-	-	-	-	-	-	-
221	-	+	-	-	-	-	-	-	-
222	-	+	-	-	-	-	-	-	-
223	-	-	+	-	-	-	-	-	-
224	-	+	-	-	-	-	-	-	-
225	+	-	-	-	-	-	-	-	-
226	-	-	-	-	-	+	-	-	-
227	-	-	+	-	-	-	-	-	-
228	-	-	+	-	-	-	-	-	-
229	-	-	+	-	-	-	-	-	-
230	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	+	-	-	-	-	-	-
46	-	-	+	-	-	-	-	-	-
89	-	+	-	-	-	-	-	-	-
93	-	+	-	-	-	-	-	-	-
97	-	-	+	-	-	-	-	-	-
101	-	+	-	-	-	-	-	-	-
113	-	-	+	-	-	-	-	-	-
128	-	+	-	-	-	-	-	-	-
137	-	-	-	-	-	-	-	-	+
152	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Из таблицы 1 видно, что бактериальная ДНК была обнаружена во всех клинических образцах. В большинстве случаев обнаруживались микроорганизмы *K. pneumoniae* и *H. alvei* - в 30 и 19 образцах соответственно. Это может свидетельствовать о том, что ОКИ, вызванная *K. pneumoniae* и *H.alvei* являются наиболее часто встречаемой инфекцией. Меньшей встречаемостью обладает *E. coli* и *C. freundii*, которые были обнаружены в 8 образцах. *Sh. flexneri* был выявлен в 5 случаях. *S. enteritidis* и *P.morganii* встречались в всего один раз, *St. aureus* и *P. aeruginosa* не обнаружен ни в одном случае.

Частота встречаемости и процентное соотношение условно – патогенных энтеробактерий и *Staphylococcus aureus* в клинических образцах представлено на рисунке 6.

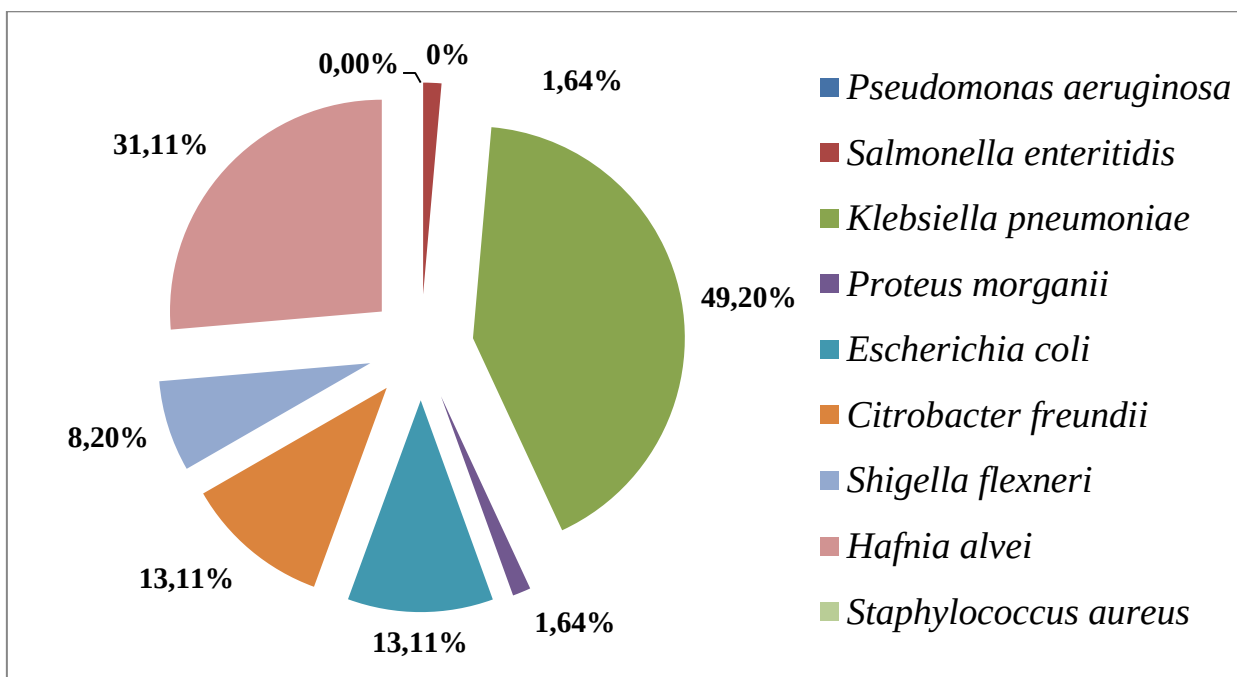


Рис. 6. Частота встречаемости и процентное соотношение встречаемых условно – патогенных энтеробактерий и *Staphylococcus aureus* в клинических образцах.

В ходе проведения ПЦР - анализа клинических образцов, выделенных от больных ОКИ, наибольшее количество раз были обнаружены микроорганизмы *K. pneumoniae*, *H. alvei*, *E. coli*, *C. freundii*.

С наибольшей частотой обнаруживался условно - патогенный микроорганизм *K. pneumoniae*, что составило 49,2% от общего числа *Enterobacteriaceae*. ДНК микроорганизма *H. alvei* была выявлена в 31,2% случаев, *E. coli* – в 13,1% случаев, *C. freundii* были обнаружены в 13,1% случаев. *P. morganii* и *S. enteritidis* были обнаружены в 1,6% случаев. *St. aureus* и *P. aeruginosa* вовсе не были выявлены.

Наши результаты исследования не соответствуют результатам исследования, проведенные Михайловой Л.В. [2011]. Михайлова Л.В. показывают, что основными возбудителями этих острых кишечных инфекций являлись протеи, клебсиеллы и цитробактер (35,0%; 33,8% и 20,5% соответственно). Среди этиопатогенов были золотистый стафилококк (3,4%), псевдомонады и энтеробактеры (0,3% равнозначно), гафнии (0,1%).

С помощью полученных данных мы определили представленность тех или иных *Enterobacteriaceae* в анализируемом клиническом материале.

Результаты сравнительного анализа приведены на рисунке 7.

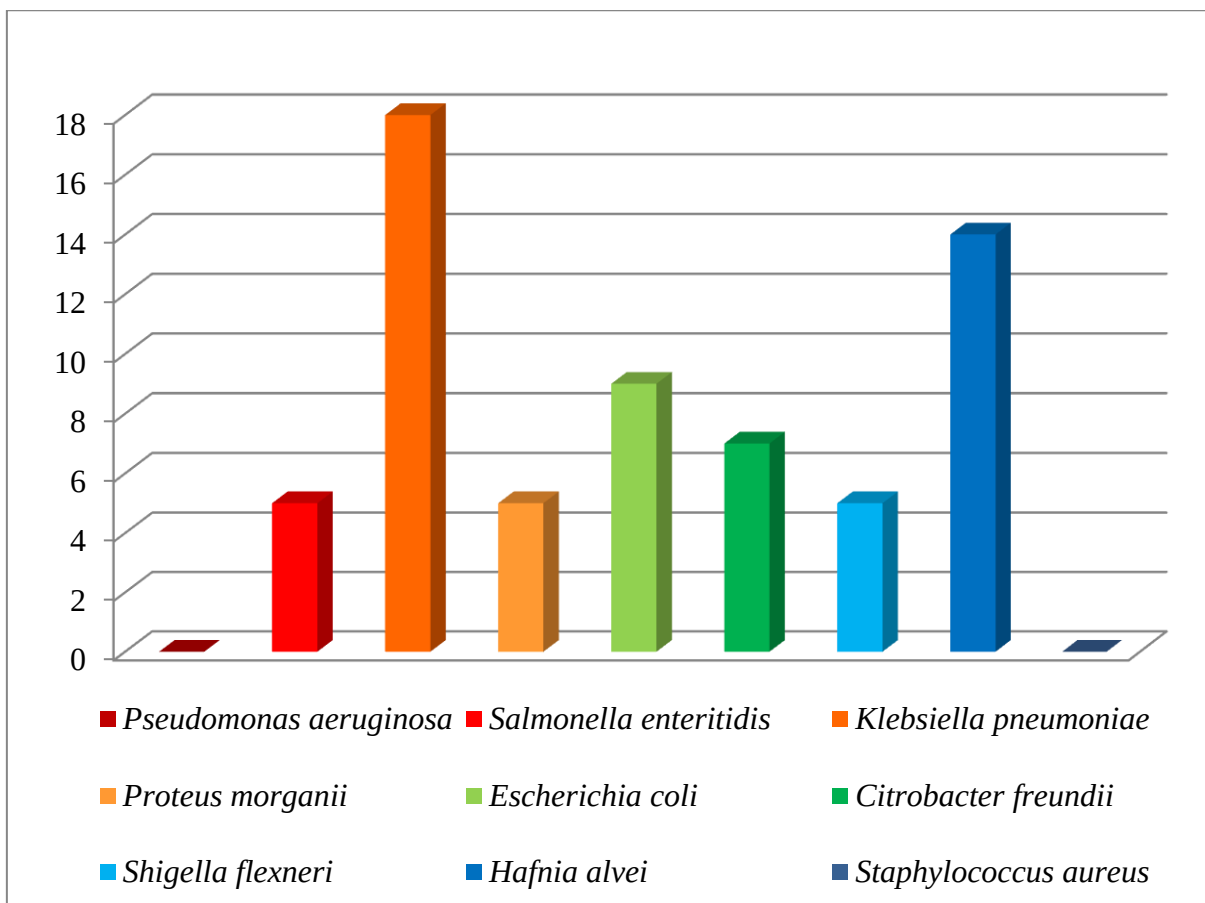


Рис. 7. Сравнение количества обнаружений представителей *Enterobacteriaceae* и *Staphylococcus aureus* в анализируемом клиническом материале.

Как видно из рисунка 7, в анализируемом нами клиническом материале, безусловно-патогенные энтеробактерии обнаруживались реже условно-патогенных. Наименьшее число раз были обнаружены *S. enteritidis*, *P. morganii*, *Sh. flexneri*. Из условно - патогенных энтеробактерий наиболее представленными оказались виды микроорганизмов: *K. pneumoniae*, *H.alvei*, *E. coli*. Однако следует отметить, что эти данные могут и не отражать реальную эпидемиологическую ситуацию, так как ДНК в образцах выделялась в разных количествах и разного качества. К тому же некоторые пары праймеров могут работать более эффективно, а другие хуже.

3.2. Сравнительный анализ генотипических и фенотипических методов определения видового состава микробиоты

Из части клинического материала дополнительно был осуществлен бактериологический посев и проведено фенотипическое определение видового состава микроорганизмов. Далее представлена таблица, которая отражает сравнение фенотипического и генотипического методов определения микроорганизмов.

Таблица 2. Сравнительный анализ генотипических и фенотипических методов определения видового состава микробиоты.

№ клинического образца	Генотипическое определение (ПЦР – анализ)	Фенотипическое определение (бак.посев)
1	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
15	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Shigella flexneri</i>
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
21	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Proteus morganii</i>
34	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Escherichia coli</i>
36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
40	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
41	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
46	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella flexneri</i>
65	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
66	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
68	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
78	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
99	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

№ клинического образца	Генотипическое определение (ПЦР – анализ)	Фенотипическое определение (бак.посев)
103	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
112	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
118	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabillis</i>
120	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella flexneri</i>
122	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
128	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
129	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
132	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
133	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella flexneri</i>
141	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
142	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella flexneri</i>
152	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
174	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Escherichia coli</i>
176	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella flexneri</i>
178	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
181	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
183	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
186	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
190	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
198	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
210	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
218	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
219	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Shigella flexneri</i>
220	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
221	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabillis</i>
222	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

№ клинического образца	Генотипическое определение (ПЦР – анализ)	Фенотипическое определение (бак.посев)
223	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
224	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
225	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
226	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia coli</i>
227	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Proteus morganii</i>
228	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
229	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
230	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1	<i>Hafnia alvei</i>	—
46	<i>Hafnia alvei</i>	—
89	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—
93	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—
97	<i>Hafnia alvei</i>	—
101	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—
113	<i>Hafnia alvei</i>	—
128	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—
137	<i>Hafnia alvei</i>	—
152	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—

Примечание: «—» - исследование не проводилось.

Из таблицы 2 видно, что вопреки ожиданиям, совпадений довольно мало. Самое большое количество совпадений определений по генотипу и фенотипу характерно для *S. enteritidis* и *K. pneumoniae*. *H. alvei* и *C. freundii* определялись только при помощи ПЦР, то есть эти бактерии, являющиеся этиологическими агентами ОКИ, удалось идентифицировать только при помощи ПЦР - анализа.

Частота встречаемости *Enterobacteriaceae* и *Staphylococcus aureus* при фенотипическом и генотипическом методах исследования представлена в таблице 3.

Таблица 3. Частота встречаемости *Enterobacteriaceae* и *Staphylococcus aureus* при фенотипическом и генотипическом методах исследования

Микроорганизмы	Бак.посев	ПЦР	χ^2	p
<i>St. aureus</i> *	15	1	7,53	0,0061
<i>K.pneumoniae</i> *	10	18	42,72	<0,0001
<i>Sh. flexneri</i>	7	5	1,00	0,3178
<i>E. coli</i> *	6	9	7,63	0,0057
<i>Ps. aeruginosa</i>	4	—	2,34	0,1260
<i>P. morganii</i>	4	5	2,34	0,1260
<i>S. enteritidis</i>	3	5	1,00	0,3178
<i>H.alvei</i> *	—	14	43,76	<0,0001
<i>C. freundii</i> *	—	7	0,51	0,4751

Примечание: «—» - исследование не проводилось.

*— статистически значимые различия $p < 0,05$.

В таблице 3 представлены микроорганизмы, встречающиеся при исследовании культуральным и молекулярно – генетическим методом. Метод ПЦР – анализа оказался намного эффективнее для некоторых бактерий, таких как, *K. pneumoniae* ($\chi^2 = 42,72$, $p < 0,05$), *H. alvei* ($\chi^2 = 43,76$, $p < 0,05$), *E.coli* ($\chi^2 = 7,73$, $p = 0,0057$), *C. freundii* ($\chi^2 = 0,51$, $p = 0,4751$), *S. enteritidis* ($\chi^2 = 1,00$, $p = 0,3178$), *P. morganii* ($\chi^2 = 2,34$, $p = 0,1260$), *Sh. flexneri* ($\chi^2 = 1,00$, $p = 0,3178$).

Оценка культурального метода детекции возбудителей ОКИ в группе ОКИУЭ составила 83,6%. Этот показатель в исследовании методом ПЦР возрос на 16,4%.

Сравнение результатов бактериологического исследования и ПЦР в группе ОКИУЭ представлены на рисунке 8.

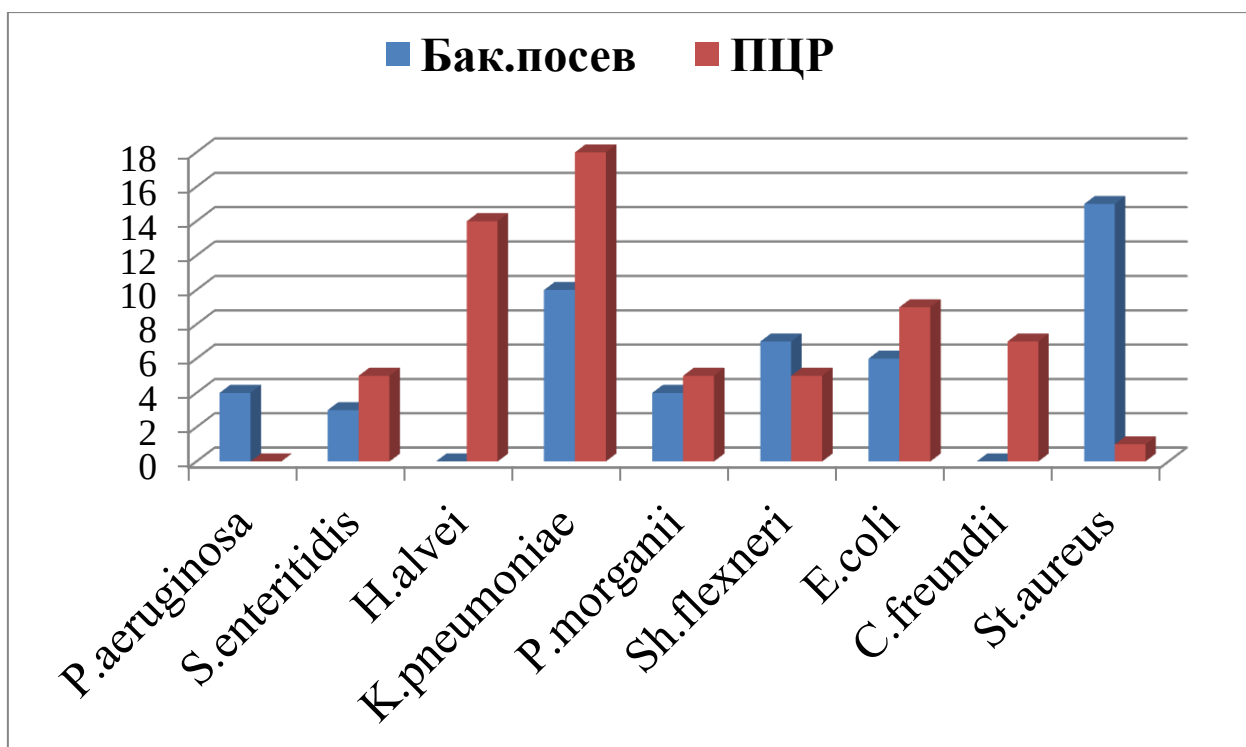


Рис. 8. Сравнение результатов бактериологического исследования и ПЦР в группе ОКИУЭ.

Как видно из рисунка 8 наиболее эффективным методом для детекции и идентификации *S. enteritidis*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *H. alvei*, *C. freundii* и *P. morganii* является метод ПЦР – анализа.

В результате бактериологического исследования испражнений больных в группе ОКИУЭ были обнаружены основные виды бактерий: *St. aureus*, *K. pneumoniae*, *Sh. flexneri*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *P. morganii*, *S. enteritidis*.

Бактериологический посев показал, что чаще всего в 15 клинических образцах встречаются *St. aureus* под номерами: 18, 36, 40, 41, 66, 68, 112, 128, 181, 183, 210, 218, 222, 223, 224, 228. *K. pneumoniae* обнаружена в 10 случаях под номерами: 4, 65, 141, 152, 186, 190, 198, 230. *Sh. flexneri* выявляется в 7 клинических образцах под номерами: 15, 46, 120, 129, 142, 176, 219.

При фенотипическом исследовании было выяснено, что *E. coli* встречается в 6 образцах под номерами: 34, 103, 122, 174, 220, 226. *P. morganii* выявлен в 4 клинических образцах под номерами: 21, 118, 221, 227. *Ps. aeruginosa* обнаружен в 4 исследуемых образцах под номерами: 1, 99, 178, 229. Наименьшее количество раз встречается *S. enteritidis*. Выявлена в 3 образцах под номерами: 2, 78, 129.

Результат количества идентифицируемых *Enterobacteriaceae* и *Staphylococcus aureus* культуральным методом определения видового состава представлены на рисунке 9.

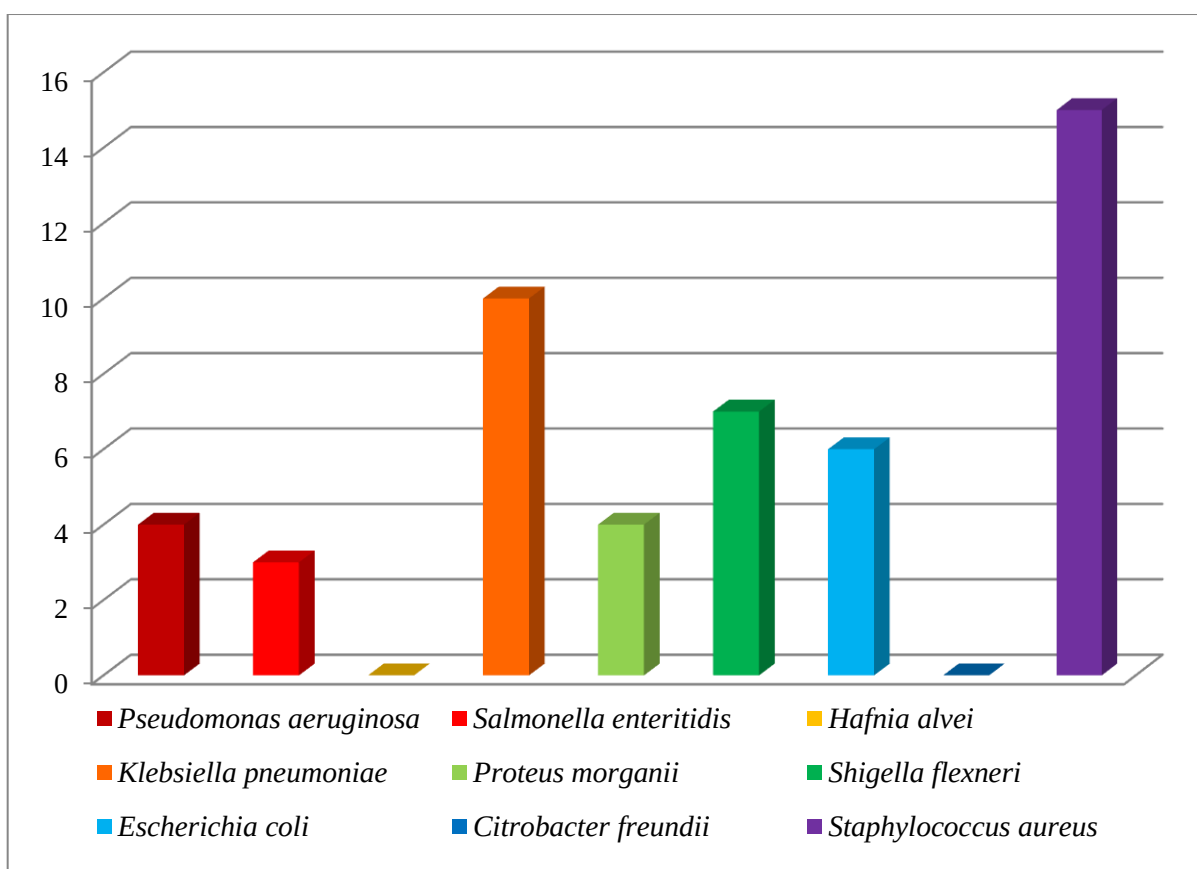


Рис. 9. Результат идентифицируемых штаммов культуральным методом определения видового состава.

Частота встречаемости и процентное соотношение количества обнаружений представителей *Enterobacteriaceae* и *Staphylococcus aureus* в анализируемом клиническом материале, выявленных методом бактериального посева представлена на рисунке 10.

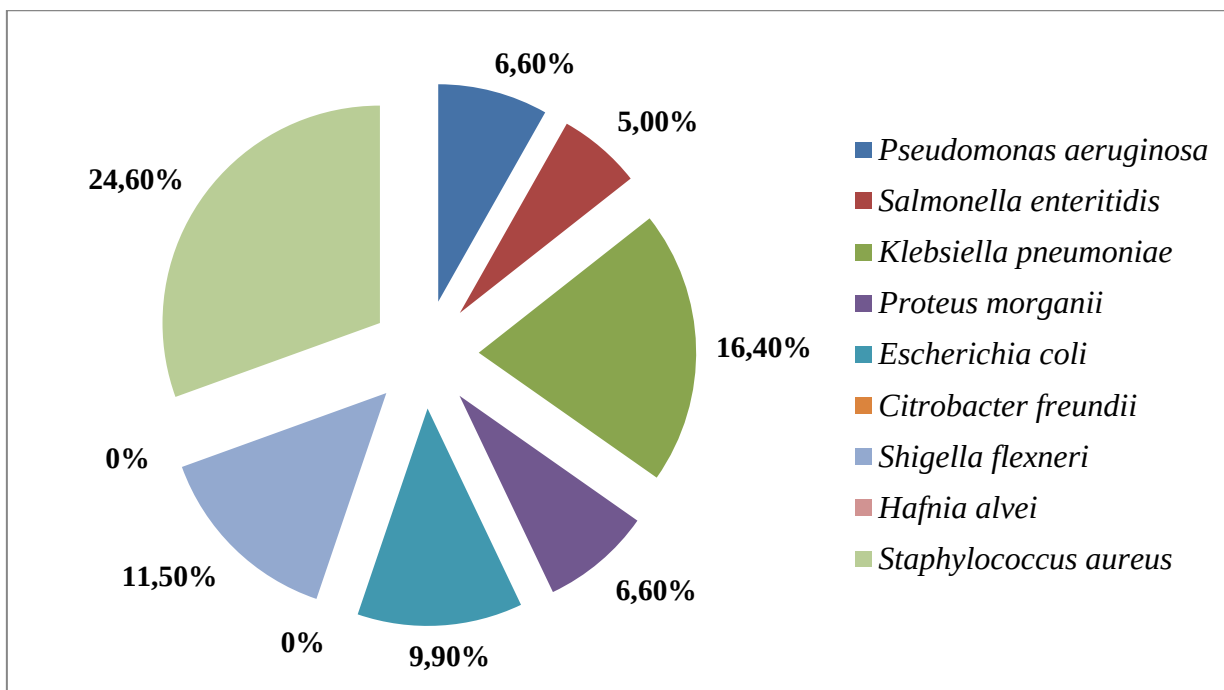


Рис. 10. Частота встречаемости и процентное соотношение количества обнаружений представителей *Enterobacteriaceae* и *Staphylococcus aureus* в анализируемом клиническом материале, выявленных методом бактериального посева.

В результате фенотипического определения видового состава наиболее часто идентифицировались *St. aureus*, *K.pneumoniae*, *Sh. flexneri*, *E. coli*, что составляет 24,%, 16,4%, 11,5%, 9,9% соответственно. *P. morganii* и *Ps. aeruginosa* выявлены в 6,6% случаев. *S. enteritidis* составила 5,0% от общего числа всех обнаруженных *Enterobacteriaceae*.

Для бактериальных кишечных инфекций свойственны одноклеточная локализация возбудителя (желудочно – кишечный тракт), одинаковые механизмы и пути заражения (фекально – оральный, контактно – бытовой), сходные кишечные проявления болезни (расстройство функции кишечного тракта). Источником инфекции может являться больной клинически выраженной или стертой формой кишечной инфекции, а также носитель. Инкубационный период (с момента попадания возбудителя до появления первых признаков болезни) длится от 6 часов до 2х суток, реже дольше. Возбудителей кишечных инфекций довольно много, но клинически они проявляют себя довольно типично.

В таблице 4 будут представлены характерные клинические признаки острых кишечных инфекциях, вызванных *Enterobacteriaceae*.

Таблица 4. Характерные клинические признаки острых кишечных инфекций, вызванных *Enterobacteriaceae*.

Микроорганизм, вызвавший ОКИ	Клинические проявления				
	Состояние здоровья	Стул (жидкий, кашецеобразный)	Рвота	Температура тела	Боли в животе
<i>K. pneumoniae</i>	Среднетя желое	Жидкий стул	Рвота 2-3р	37,7 - 38,7	+
<i>E. coli</i>					
<i>P. morganii</i>	Тяжелое	Жидкий стул	Рвота 2-4р	38,2-39,0	+
<i>Sh. flexneri</i>					
<i>S. enteritidis</i>	Тяжелое	Кашецеобразный стул	Рвота 2-3р	38,0-39,0	+
<i>C. freundii</i>					
<i>H. alvei</i>	Тяжелое	Жидкий стул	Рвота 1-3р	37,8-38,9	+
<i>St. aureus</i>					

Из таблицы 4 видно, что, ОКИ, вызванная *E. coli* и *K. pneumoniae* имеют общие признаки проявления инфекции. Так же общие клинические проявления имеют *P. morganii* и *Sh. flexneri*, *S. enteritidis* и *C. freundii*, *H. alvei* и *St. aureus*. Наши данные соответствуют литературным данным.

3.3. Амплификация участков ДНК, кодирующих факторы патогенности условно – патогенных микроорганизмов

Развитие диареи обуславливается различными факторами. В настоящее время установлено, что в инициировании диарейного синдрома при инфицировании УПЭ могут участвовать энтеротоксины, гемолизин, цитолетальный расширяющий токсин, адгезины, модулины (в т.ч. липополисахарид).

В данной работе мы определили генетические детерминанты некоторых факторов патогенности, собранных в «острова» патогенности у *K. pneumoniae* и *E. coli*. Бактерии тестировали с помощью ПЦР на наличие генов, определяющих способность бактерий синтезировать гемолизины (*hlyA*, *hlyB*, *hlyD*), пили А и С (*bfpA* и *bfpC*), цитолетальный расширяющий токсин (*cdtA* и *cdtB*), адгезин-интимин *eae*, фактор персистенции *ivu*.

Нам удалось обнаружить наличие генов, кодирующих гемолизины (*hlyA*, *hlyB*, *hlyD*) у представителей *Enterobacteriaceae*, а именно у *K. pneumoniae* и *E. coli*. Как утверждает Анганова Е.В. [2012], что у *K. pneumoniae* выявлены практически все изучаемые генетические маркеры «островов» патогенности. При этом наибольшая частота обнаружения была характерна для нуклеотидных последовательностей генов *hlyA*.

Таким образом, ген кодирующий гемолизин *hlyA* был обнаружен в 12 образцах под номерами: 46, 65, 68, 128, 129, 174, 198, 218, 31, 96, 126, 137, что соответствует *K. pneumoniae*.

Электрофореграмма некоторых результатов ПЦР гена, кодирующего гемолизин *hlyA* показана на рисунке 11.

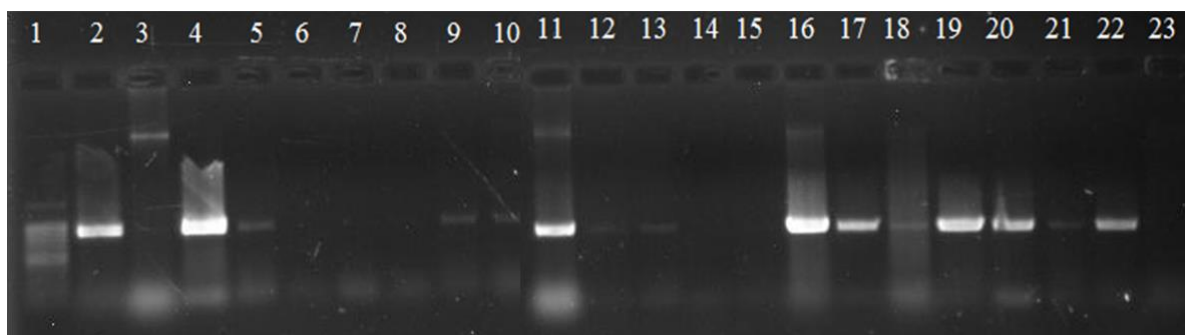


Рис. 11. Электрофореграмма результатов ПЦР генов, кодирующих гемолизин *hlyA*. 1 – маркер молекулярного веса (Сибэнзим), 2 – 23 – результаты ПЦР участка гена *hlyA* размером 865 п.н.

Ген *hlyB* был выявлен в образцах под номерами: 6, 18, 34, 46, 78, 128, 129, 174, 28, 34, 55, 58, что также соответствует гену *K. pneumoniae*.

Электрофореграмма некоторых результатов ПЦР генов *hlyB* представлена на рисунке 12.

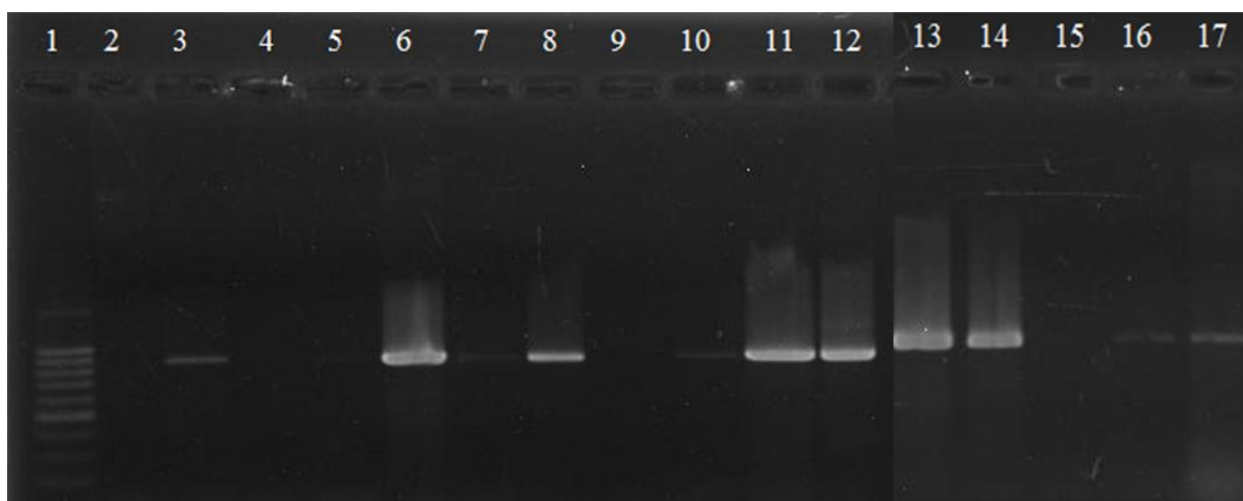


Рис. 12. Электрофореграмма некоторых результатов ПЦР гена *hlyB*. 1 – маркер молекулярного веса (Сибэнзим), 2 – 17 – результаты ПЦР участка гена *hlyB* размером 558 п.н.

Результаты по выявлению генетических маркеров патогенности у культур, выделенных от больных, сопоставимы с исследованиями Жеребцовой Н.Ю. [2007], показавших, что при выявлении нуклеотидных последовательностей генов *hlyA* и *hlyB* на культуры, полученные от пациентов, приходилась самая большая доля данных детерминант.

Ген, кодирующий гемолизин *hlyD* был обнаружен в геноме *K. pneumoniae* под номерами: 34, 46, 128, 129, 198, 14, 174, 46, 152.

Электрофореграмма некоторых результатов ПЦР генов *hlyD* представлена на рисунке 13.

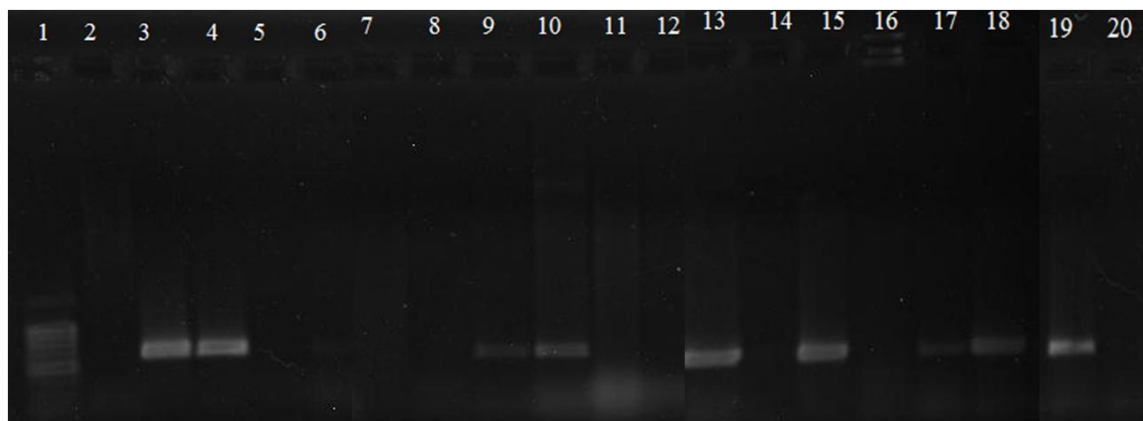


Рис. 13. Электрофореграмма некоторых результатов ПЦР генов *hlyD*. 1 – маркер молекулярного веса (Сибэнзим). 2 – 20 – результаты ПЦР участка гена *hlyD* размером 601 п.н.

Ген *ivu* был обнаружен в большинстве клинических образцов, принадлежащих *K. pneumoniae*. Выявлен под номерами: 4, 6, 36, 40, 46, 65, 66, 68, 118, 120, 122, 128, 129, 133, 219, 223, 224, 225, 227, 229, 230, 1, 89, 93, 113. Это может свидетельствовать о наличии в выявляемых нами *K. pneumoniae* «островов» патогенности.

Электрофореграмма результатов представлена на рисунке 14.

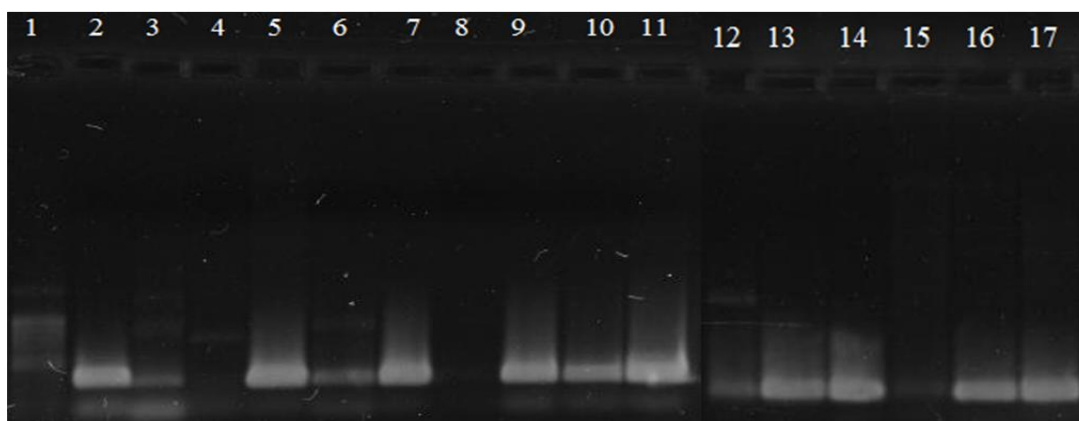


Рис. 14. Электрофореграмма результатов ПЦР специфических участков ДНК факторов патогенности *ivu*: 1 – маркер молекулярного веса (Сибэнзим). 2 – 17 - ампликоны гена *ivu* размером 321 п.н.

Также, нам удалось выявить ген *eae* в образцах *E. coli*. Искомый ген *eae* был обнаружен в образцах под номерами: 65, 129, 230, 97, 113.

Результат электрофореграммы представлен на рисунке 15.

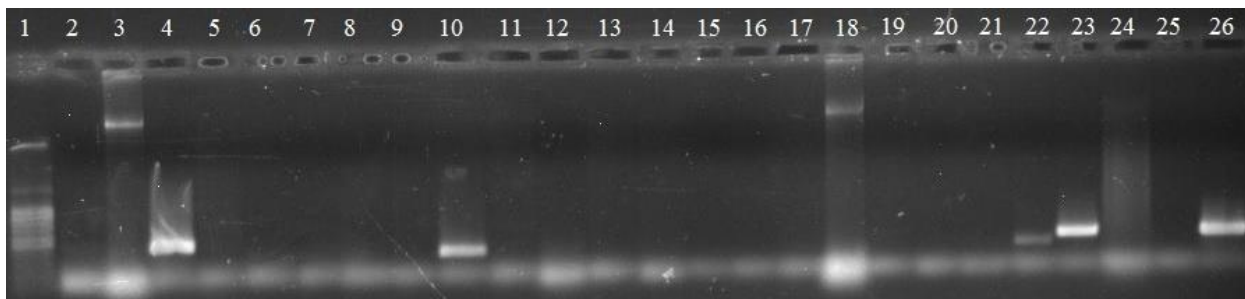


Рис. 15. Электрофореграмма результатов ПЦР специфических участков ДНК факторов патогенности *eae*. 1 – маркер молекулярного веса (Сибэззим). 2 – 26 - ампликоны гена *eae* размером 405 п.н.

Используя данные о факторах патогенности и персистенции, к ним были подобраны пары праймеров. С помощью этой пары праймеров, используя ПЦР - анализ, в короткие сроки можно определить адгезин-интимин (*eae*) у *Escherichia coli*, а фактор персистенции (*ivy*) и гемолизины (*hlyA*, *hlyB*, *hlyD*) у штамма *Klebsiella pneumoniae*. Тем самым, можно определить видовой состав и этиологическую значимость микроорганизма в развитии ОКИ. Таким образом, нами в ходе работы было показано, что выявление нами при ПЦР – анализе бактерии с высокой долей вероятности и являются этиологическими агентами при развитии ОКИ.

Количество выявленных «островов» патогенности методом ПЦР – анализа показано на рисунке 16.

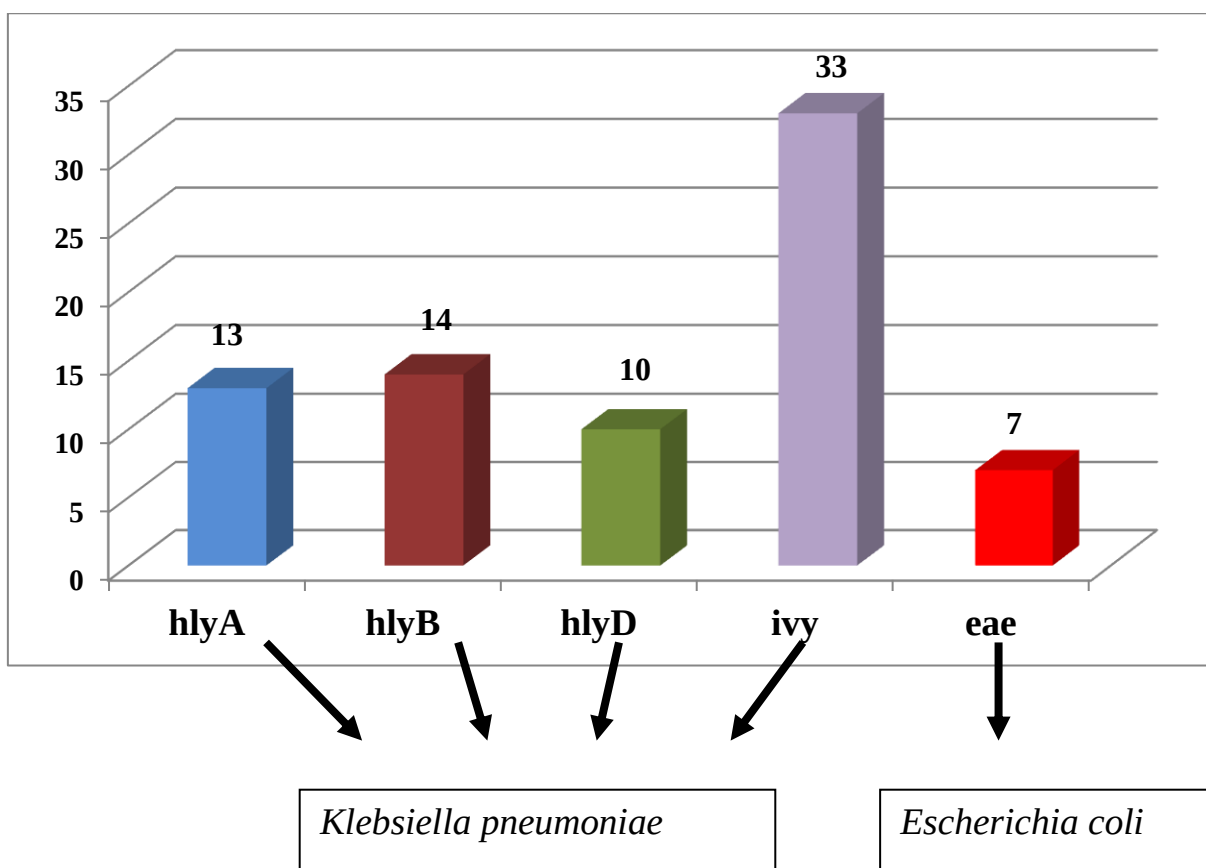


Рис. 16. Количество выявленных «островов» патогенности методом ПЦР – анализа.

Из рисунка 16 видно, что наиболее часто встречаемым фактором патогенности является фактор персистенции *ivy*, выявленным у *K. pneumoniae*. Также необходимо отметить, гены, кодирующие гемолизины *hlyA*, *hlyB*, *hlyD* были представлены в клинических образцах, что принадлежат *K. pneumoniae*. Ген фактора адгезин – интимина (*eae*) был выявлен у *E. coli*. Полученные нами результаты исследования совпадают с литературными данными, опубликованными ранее.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения данной работы, нами были собраны клинические образцы у 61-го пациента со среднетяжелыми формами ОКИ. Далее из исследуемых клинических образцов, а именно испражнений, культуральным методом были выделены и исследованы штаммы условно - патогенных и патогенных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*. Следующим этапом нашего исследования стало выделение тотальной ДНК из клинического материала, используя стандартные наборы («Рибо-Сорб», Россия). Нами были подобраны олигонуклеотидные праймеры к участкам ДНК для идентификации ряда микроорганизмов, вызывающих ОКИ. В ходе проведения ПЦР - анализа клинических материалов, выделенных от больных ОКИ, наибольшее количество раз обнаруживались *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Escherichia coli*, *Proteus morganii*.

Сравнение фенотипических и генотипических методов идентификации микроорганизмов вопреки ожиданиям показало довольно мало совпадений. Самое большое количество совпадений определений по генотипу и фенотипу было характерно для *Salmonella enteritidis* и *Klebsiella pneumoniae*. *Hafnia alvei* и *Citrobacter freundii* определялись только при помощи ПЦР, то есть эти бактерии являющиеся этиологическими агентами ОКИ, видимо, вовсе не удавалось вырастить в культуре.

Для определения факторов патогенности и персистенции УПЭ нами были выбраны следующие гены: *eae*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyC*, *hlyD*, *ivu*. Ген *eae* был обнаружен в образцах с ДНК *E.coli*. Ген *ivu* присутствовал в большинстве клинических образцов, принадлежащих *Klebsiella pneumoniae*. Также были обнаружены гены, кодирующие гемолизины (*hlyA*, *hlyB*, *hlyD*) были у *Klebsiella pneumoniae*. Эти данные могут свидетельствовать, что по крайней мере, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* могут обмениваться между собой генами патогенности.

Более того, обнаружение генетических детерминант служит косвенным доказательством того, что именно обнаруженные нами энтеробактерии и являются причиной острой кишечной инфекции у анализируемых больных.

ВЫВОДЫ

1. Собрана коллекция тотальной ДНК из 61 клинического материала, выделенных при острых кишечных инфекциях.

2. Подобраны и апробированы пары праймеров для ПЦР-идентификации видового состава энтеробактерий. ПЦР - анализ показал, что при острых кишечных инфекциях в клиническом материале наиболее часто встречается ДНК *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Escherichia coli*, *Proteus morganii*.

3. Произведено сравнение фенотипического и генетипического методов исследования клинических образцов. Самое большое количество совпадений по генотипу и фенотипу было характерно для *Salmonella enteritidis* и *Klebsiella pneumoniae*. *Hafnia alvei* и *Citrobacter freundii* удалось обнаружить только при помощи ПЦР. Подобраны и апробированы пары праймеров для ПЦР-анализа генов факторов патогенности (*eae*, *ivu*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyD*). У *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* были идентифицированы генетические детерминанты *ivu*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyD*, *eae*. Полученные данные могут свидетельствовать, о возможности обмена «островами» патогенности между *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*.

4. Испытанные на клиническом материале пары праймеров могут быть использованы при создании диагностических тест-систем для видовой идентификации и определения этиологической роли *Enterobacteriaceae* в развитии ОКИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамзон О.М. Биологические свойства микроорганизмов как основа прогнозирования тяжести гнойно-воспалительных заболеваний легких и плевры /О.М. Абрамзон, О.Л. Карташова, А.В. Валышев, и др.// Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.-2004.-№3. С.7-10.
2. Азнабаев Г.К. Биологические свойства бактерий рода *Citrobacter*, выделенных при моно- и ассоциированных бактериальных инфекциях. Автореферат дисс. канд.мед.наук. Оренбург- 2003.
3. Андрейчин,М.А. Бактериальные диареи / М.А. Андрейчин, О.Л. Ивахив. - Киев: Здоров'я, 1998. - 412с.
4. Анганова Е.И. Бактерии рода *Klebsiella* в этиологической структуре бактериальных ОКИ: оценка их патогенности на уровне фено- и генотипа // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2011. - № 6 (61). С. 62-65.
5. Анганова Е.И. Условно-патогенные энтеробактерии: доминирующие популяции, биологические свойства, медико-экологическая значимость: Автореф. дисс. ...доктора биол. наук. Иркутск, 2012. - 47 с.
6. Анганова Е.В., Савилов Е.Д., Духанина А.В., Чемезова Н.Н., Распопина Л.А. Генетические маркеры патогенности условно-патогенных энтеробактерий в оценке их этиологической значимости при острых кишечных инфекциях у детей // Инфекция и иммунитет. 2012, Т.2, № 1-2. (Материалы Хсъезда ВНПОЭМП «Современное лабораторное обеспечение эпидемиологических исследований и профилактических мероприятий») С. 237.
7. Анисимов А.П. Молекулярно-генетические механизмы образования и функциональная значимость капсулы *Yersinia pestis*: Автореф. дисс. ...доктора мед.наук. Саратов, 2000. – 39 с.

8. Ахтариева А.А., Савченко Т.А., Саляхов Р. З, Камалова А.А. Гемолитическая активность бактерий рода *Enterobacter* // Башкирский государственный медицинский университет; Материалы конференции успехи современного естествознания. - Уфа, 2003. - №8.
9. Блохина И. Н. Дисбактериозы / И. Н. Блохина, В. Г. Дорофейчук. – Л.: Медицина. Ленингр. отд-ние, 1979. – 176 с.
10. Боковой А.Г. Роль условно-патогенных микроорганизмов в этиологии острых кишечных инфекций и проблема дисбактериоза кишечника у детей: автореф. дис. ... докт. мед. наук. - М., 1991. - 35с.
11. Бондаренко В. М., Петровская В.Г. Потатуркина-Нестерова Н.И. Проблема патогенности клебсиелл. – Ульяновск: УлГУ, 1998. – 132 с.
12. Бондаренко, В.М. Факторы патогенности бактерий и их роль в развитии инфекционного процесса / В.М. Бондаренко // Журн. микробиол. - 1999. - №5. - С.34-39.
13. Бондаренко В. М. Дисбактериоз кишечника как клинко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы / В. М. Бондаренко, Т. В. Мацулевич. – М.: ГЭОТАР-медиа, 2007. –300 с.
14. Брилис В.И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов./ Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. // Лабораторное дело.- 1986.- №4.-С.210-212.
15. Булгаков А.К, Актибиотикоустойчивость условно-патогенных энтеро-бактерий / А-К- Булгаков, З.Г. Габидуллин // Здравоохранение Башкортостана. 2000. - №3. - С.55-58.
16. Бухарова Е.В., Попкова С.М., Ракова Е.Б., Джигоев Ю.П., Немченко У.М., Иванова Е.И. Биологическая и генетическая характеристика аутоштаммов *Klebsiella* spp., выделенных от детей и взрослых // Известия Иркутского государственного университета. – 2014. – Т.7. Серия «Биология. Экология». С. 45-55.
17. Вартанян Ю.П. Отек лап белых мышей-тест для оценки активности энтеротоксинов/Ю.П.Вартанян, М.К. Северцева, О.И.

Введенская, Е.С. Станиславский // Бюлл. эксп. биол. и медицины. - 1978. - №2. - С. 150-152.

18. Васильев, Б.Я. Острые кишечные заболевания. Ротавирусы и ротавирусная инфекция / Б.Я. Васильев, Р.И. Васильева, Ю.В. Лобзин. - СПб.: 2000. - 272с.

19. Воротынцева Н.В. О классификации острых желудочно-кишечных инфекций у детей / Н.В. Воротынцева, Н. Милютина, О.А. Каншина // Вопросы охраны материнства и детства. 1985. - С.63-67.

20. Габидуллин Ю.З. Особенности некоторых свойств, определяющих патогенный потенциал сокультивируемых вариаций бактерий *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *E.coli*, *Proteus*: Дисс. на соискание ученой степени...доктора мед.наук. Уфа, 2015. - 274 с.

21. Гизатуллина С.С. Условно-патогенные энтеробактерии при острых кишечных инфекциях у детей раннего возраста и совершенствование их микробиологической диагностики: автореф. дис. ... канд. мед.наук. - М., 1989. - 24с.

22. Далин, М.В. Белковые токсины микробов / М.В. Далин, Н.Г. Фиш // - М., 1980. - С. 179-180.

23. Данилина Л.Н., Бажажина Н.А., Ульянова Л.А., Ушанова Е.В., Попова Т.А. О групповой заболеваемости ОКИ в специальной общеобразовательной школе-интернате г.Тулы // Инфекция и иммунитет. 2012, Т.2, № 1-2. (Материалы X съезда ВНПОЭМП «Современное лабораторное обеспечение эпидемиологических исследований и профилактических мероприятий») С. 257.

24. Джораева С.К., Гончаренко В.В., Щеголева Е.В., Щербакова Ю.В., Безрученко А.А. Состав и функции микробиоценозов различных биотопов макроорганизма и клиническая значимость их нарушений // Дерматология та венерология – 2015. - №2 (68). – С 5-19.

25. Дисбактериозы желудочно-кишечного тракта / В. М. Бондаренко [и др.] // Рос.журн. гастроэнтерол. гепатол. колонопроктол. – 1998. – № 8. – С. 66–70.
26. Дьяченко, А.Г. Особенности иммунного ответа при острых кишечных инфекциях, вызванных патогенными энтеробактериями / А.Г. Дьяченко, В.В. Липовская, П.А. Дьяченко // Журн. Микробиол. - 2001. - №5. - С.110-113.
27. Егорова С.А., Забровская А.В., Лавренева И.С. Характеристика микрофлоры при дисбиозе кишечника и способы ее коррекции // Современные средства иммунодиагностики, иммуно- и экстренной профилактики актуальных инфекций: материалы науч. конф. с междунар. участием (ВМА, СПб., 2004). — СПб., 2004. — С. 179–181.
28. Егорова С.А., Макарова М.А., Кафтыреева Л.А. Этиологическая значимость условно патогенных энтеробактерий при острых кишечных заболеваниях и дисбиотических состояниях кишечника // Инфекция и иммунитет – 2011. – Т.1, № 2.- С.181-184.
29. Ефимочкина Н.Р. Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа: дисс.на соискание ученой степени доктора биологических наук. Москва, 2010. – 348 с.
30. Жеребцова Н.Ю. Клинико-лабораторные особенности острых кишечных инфекций, вызванных условно патогенными энтеробактериями у детей и подростков: Автореф. дис. ... канд. мед.наук. - Уфа, 2006.-24с.
31. Жеребцова Н.Ю., Баймиев А.Х., Валишин Д.А., Мавзютов А.Р. Генетические маркеры патогенности условно патогенных энтеробактерий, выделенных у детей и подростков при острых кишечных инфекциях // Журн. микробиол. — 2007. — № 2. — С. 3.

32. Заикина, О.Л. Клиническое значение антилизосимного признака возбудителей инфекции мочевой системы у детей. Автореф. дис. ...к.м.н. Оренбург, 1995. – 20 с.

33. Клинико-микробиологические особенности острой кишечной микст-инфекции, вызванной бактериями *Hafnia alvei* и ротавирусом / Н.М. Грачева, Н.И. Леонтьева, В.М. Бондаренко // Журн. микробиол. - 2003. - №2. - С.62-65.

34. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. – СПб., 1998. - С

35. Костюковская, О.Н. К вопросу о роли бактерий рода *Citrobacter* в этиологии острых кишечных заболеваний / О.Н. Костюковская, Е.А. Гладкая, В.Т. Бунин и др. // Кишечные инфекции. - Киев, 1981. -№13. -С.74-77.

36. Кочорбаев, Т.К. Изучение этиологического значения условно-патогенных микроорганизмов при остром аппендиците / Т.К. Кочорбаев, Т.А.Абдыкеримова // Проблемы клинической микробиологии в неинфекционной клинике. - Винница, 1983. - С.60-61.

37. Кошнина, Е.П. О сочетанном поражении слизистых оболочек бронхов и желудочно-кишечного тракта при атопическом синдроме и крапивнице./ Кошнина Е.П., Колганова Н.А., Фурмон Н.Е., Грачева Н.М., Щербаков И.Т., Аваков А.А., Соловьева А.И. // Пульмонология. - 1984.- №3.-С.22-23.

38. Леванов А.В. Феномен бактериальной транслокации условно-патогенных микроорганизмов из желудочно-кишечного тракта / А.В. Леванов // Антибиотики и химиотерапия. – 2001. – Т46, №5. – С.28-30.

39. Леванова Л.А., Алешкин В.А., Воробьев А.А., Афанасьев С.С., Сурикова Е.В., Рубальский О.В., Алешкин А.В. Становление микрофлоры кишечника у детей первого года жизни // Журнал микробиологии. – 2001. - № 4. – С. 47-50. (а).

40. Леванова Л.А., Алешкин В.А., Воробьев А.А., Афанасьев С.С., Зинин-Бернес, Рубальский О.В., Алешкин А.В. Становление микрофлоры кишечника у детей первого года жизни // Журнал микробиологии. – 2001. - № 4. – С. 47-50. (а).
41. Мавзютов А.Р. «Острова» патогенности условно-патогенных энтеробактерий / А.Р. Мавзютов, С.В. Фиалкина, В.М. Бондаренко // Журн. микробиол. - 2002. - №6. - С.5-9.
42. Маянский, А.Н. Микробиология для врачей (очерки патогенетической микробиологии) / А.Н. Маянский. - Нижний Новгород: НГМА, 1999. - 400с
43. Микробиология: учебник для студ.высш.учеб.заведений / А.И.Нетрусов, И.Б.Котова. – М.: Издательский центр «Академия», 2006. – 352 с.
44. Микроэкологический пейзаж кишечного биоценоза у детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта / У. М. Немченко [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – № 5 (81). – С. 89–93.
45. Михайлова Л.В. Биология условно – патогенных микроорганизмов, вызывающих кишечные инфекции. автореф. дисс. на соискание ученой степени канд.мед.наук. Волгоград, 2011. С.11
46. Нисевич, Н.И. Современные проблемы инфекционной заболеваемости у детей / Н.И. Нисевич // Педиатрия. - 1995. - №4. - С.67-69.
47. Новокшенов А.А., Острые кишечные инфекции: современные подходы к лечению г. Москва Журнал «Новая аптека» № 8, 2005.
48. Очилова, Р.А. Биологические свойства штаммов *K. pneumoniae* и *S. aureus*, выделенных в виде монокультур и ассоциаций, при дисбактериозах кишечника у детей с бронхолегочной патологией: Автореф. дис. ... канд. мед.наук.- Уфа, 2004.

49. Онищенко Г.Г. Контроль за инфекционными заболеваниями - стратегическая задача XXI века. Эпидемиология и инфекционные болезни 2002; (6): 2-16
50. Петровская В.Г. Энтеротоксины энтеротоксигенных *Escherichiacoli*: характеристика, механизм действия и генетический контроль / В.Г. Петровская, В.М. Бондаренко // Журн. микробиол. - 1990. - №7. - С.92-98.
51. Петровская В.Г. Общие принципы генетического контроля патогенности бактерий / В.Г. Петровская, В.М. Бондаренко // Журн. микробиология -1994. №3, - С. 106-110.
52. Покровский В.И., Малеев В.В., Семина Н.А. Роль лабораторных исследований в диагностике и мониторинге инфекционных болезней// В.И. Покровский, В.В. Малеев, Н.А. Семина. Москва, 1995.
53. Поликарпов Н.А. Биологические свойства условно-патогенных микроорганизмов, выделенных от больных с острыми кишечными заболеваниями. / Поликарпов Н.А. // Воен.-мед.журнал.- 1991.№7.-С.19-23.
54. Постникова Е.А. Изучение качественного и количественного состава микрофлоры кишечника у клинически здоровых детей в раннем возрасте./ Постникова Е.А., Пикина А.П., Кафарская Л.И., Ефимов Б.А. // Журнал микробиол. –2004.-№1.-С.62-67.
55. Плоскирева А.А., Тхакушинова Н.Х., Горелов А.В. Результаты сравнительного исследования по оценке эффективности и безопасности пробиотиков в стартовой терапии острых кишечных инфекций вирусной этиологии у детей// Ж. Инфекционные болезни. 2013-т.11.№1. с.50-55.
56. Пинегин Б. В. Дисбактериозы кишечника / Б. В. Пинегин, В. Н. Мальцев, В. М. Коршунов. – М.: Медицина, 1984. –144 с.
57. "Руководство по инфекционным болезням" (Под ред. Ю.В.Лобзина) - С-Петербург, "Фолиант", 2000. - 932с.

58. Самсыгина, Г.А. Характеристика микробной колонизации новорожденных детей с перинатальной патологией. / Самсыгина Г.А., Бони Е.Г., Черкасская Р.С. // Педиатрия. - 1988.- №8.-С.18-22.
59. Самсыгина Г. А. Особенности становления биоценоза кишечника и кишечный дисбактериоз / Г. А. Самсыгина // Педиатрия Consilium Medicum. – 2003. – № 2. – С. 30–33.
60. Сиволодский Е.П. Систематика и идентификация энтеробактерий. Изд. второе, перераб., доп. С-Пб.: Изд-во С-Пб НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 2008. – 44 с.
61. Семенов А.В. Характеристика антагонистической активности бактерий при межмикробных взаимодействиях: Автореф. дис. ... канд. мед.наук. - Оренбург, 2009.-24с.
62. Смородова Г.П. Материалы к изучению роли вульгарного протея в этиологии острых кишечных заболеваний./ Смородова Г.П., Левина П.М., Ачкасов А.Н., Сирото В.А.// Издание «Кишечные инфекции».- Киев,1974.№7.-С.165-167.
63. Соболева Н.Т., Тхакушикова Н.Х. Подходы к комбинированной терапии острых кишечных инфекций у детей / Н.Т. Соболева, Н.Х. Тхакушикова // Журн: Вопросы современной терапии. – 2010. - №3. – С.102 – 105.
64. Таболин, В.А. Рациональная терапия дисбактериоза кишечника у детей. Методические рекомендации. / Таболин В.А., Бельме С.В., Гасилина Т.В. и др. // - М., 1998. – С.11.
65. Туйгунов, М.М. Роль Энтеротоксина бактерий рода *Citrobacter* в исходе взаимодействия «патоген-хозяин»: Автореферат д-ра. мед. наук. – Челябинск-2003.-41с.
66. Фадеев, С.Б. Видовой состав и персистентные характеристики возбудителей хирургической инфекции мягких тканей. Автореферат дисс. канд.мед.наук. Оренбург,1998.- С.24.

67. Фиалкина С.В. Генетические детерминанты патогенности клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*: Дис. канд. биол. наук: 03.00.07: Москва, 2004. РГБ ОД, 61:04-3/635. С.40.

68. Черненкая, Т.В. Чувствительность энтеробактерий к беталактамам антибиотикам. / Черненкая Т.В. // Антибиотики и химиотерапия.-2000, Т.45,№4.-С.28-29.

69. Червинец Ю.В., Беляева Е.А., Червинец В.М., Самоукина А.М., Михайлова Е.С., Пятова А.И., Червинец А.В. Нарушения микробиоты желудочно-кишечного тракта здоровых людей // Международный журнал прикладных фундаментальных исследований. – 2013, №3. С. 55-58.

70. Шайхиева Г.М., Ефимов Г.Е. Оптимизация диагностической подсистемы эпидемиологического надзора за бактериальными острыми кишечными инфекциями / Журн.: Медицинский вестник. – 2014. №6. С.13 - 18

71. Andreu A., Stapleton A.E., Fennel C. et al. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* strains causing prostatitis. // J. Infect. Dis.- 1997, 176.- P.464-469.

72. Bajaj V., Lucas R.L., Hwang C., and Lee C.A. Coordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. Mol. Microbiol. 1996, 22:703-714.

73. Bloody diarrhea caused by *Klebsiella pneumoniae*: a new mechanisms of bacterial virulence / F. Guerin, C. Le Bouguenec, J. Gilquin [et al.] // Clin. Infect. Dis. - 1998. - Vol. 27. –P.648-649.

74. Endo Y., Tsurugi K., Yutsucio T. et al. Site of action of Verotoxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:147 and Shiga toxin in eucaryotic ribosomes. // Eur. J. Biochem.- 1998, 17.- P.45-50.

75. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection induces expression of the early growth response factor by activating mitogen-activated protein kinase cascades in epithelial cells / M. DeGrado, C.M.

Rosenberger, A. Gauthier [etal.] // Infect. Immun. - 2001. - Vol. 69, No. 10. - P.6217–6224.

76. Expression of intimin g from enterohemorrhagic Escherichia coli in Citrobacter rodentium / E.L. Hartland, V. Hunter, L.M. Higgins [et al.] // Infect. Immun. - 2000. - Vol. 68, No. 8. - P.4637–4646.

77. Finlay B.B. Common themes in microbial pathogenicity / B.B. Finlay, S. Falkow // Microbiol. Rev. –1989. - V. 53. - P.210-230.

78. Harrison, L.M. Regulation of proinflammatory cytokine expression by shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides in the human monocytic cell line THP-1 / L.M. Harrison, W.C.E. Van Haaften, V.L. Tesh // Infect. Immun. – 2004. - Vol. 72, No. 5. - P.2618–2627.

79. Sears, C.L. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion / C.L. Sears, J.B. Kaper // Microbiol. Rev. – 1996. - Vol. 60, No. 1. - P.167–215.

80. Wilson, M. Bacterial perturbation of cytokine networks / M. Wilson, R. Seymour, B. Henderson // Infect. Immun. - 1998. - Vol. 66, No. 6. – P.2401–2409.

81. Yamamoto, T. Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic Escherichia coli and Vibrio cholerae 01 / T.Yamamoto, T.Gojobori, T.Yokota // J. Bacteriol. -1987. –Vol.169. –P.1352-7.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Справка об антиплагиате студентки 401 А группы Мурзиной К.А.

**Информация
о документе:**

**Имя
исходного
файла:**

Диплом – Мурзина К.А.docx

**Имя
компании:**

Башкирский государственный медицинский университет

**Тип
документа:**

Прочее

**Имя
документа:**

Диплом Мурзина

**Дата
проверки:**

25.06.2016 13:25

**Модули
поиска:**

Диссертации и авторефераты РГБ, Интернет (Антиплагиат), Кольцо вузов,
Модуль поиска ЭБС "Лань", Башкирский государственный медицинский
университет

**Текстовые
статистики:**

**Индекс
читаемости:**

обычный

**Неизвестные
слова:**

в пределах нормы

**Макс. длина
слова:**

в пределах нормы

**Большие
слова:**

выше нормы!

Оригинальные блоки: 71.81%

Заемствованные блоки: 28.19%

Заемствование из "белых" источников: 0%

Итоговая оценка оригинальности: **71.81%**



Отзыв научного руководителя на дипломную работу

студентки 4 курса обучения

медико – профилактического факультета с отделением микробиологии

ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

Мурзиной Марины Альбертовны по теме:

«Гены факторов патогенности как молекулярный маркер для определения
этиологической значимости условно-патогенных *Enterobacteriaceae*»

Студентка Мурзина Марина Альбертовна проходила дипломную практику в лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии Учреждения Российской академии наук Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН с 11 мая по 7 июня 2016 года. За время прохождения практики проявила себя как дисциплинированный, стремящийся к получению знаний, навыков и умений, ответственный, работоспособный, инициативный экспериментатор. В процессе выполнения своей дипломной работой Мурзина К. А. смогла охватить большой объем необходимой литературы. Основной задачей ее практической деятельности стало ознакомление с основными молекулярно – генетическими методами исследований: выделение ДНК, агарозный гель-электрофорез, ПЦР, хорошо ориентируется по современным биологическим базам данных и имеет хорошую теоретическую подготовку. Ко всем заданиям своей дипломной работы относилась ответственно, все поручения выполняла аккуратно.

Мурзина К. А. зарекомендовала себя с положительной стороны, нарушений правил внутреннего трудового распорядка не допускала. Замечаний к практиканту нет.

В целом Мурзина К.А. полно и точно раскрыла тему дипломной работы. Недостатков обнаружено не было. Работа допускается к защите.

Научный руководитель:

д. б. н., доцент кафедры

фундаментальной и прикладной

микробиологии



Б.Р. Кулуев

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения медико-профилактического факультета
с отделением микробиологии

ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

Мурзиной Карины Альбертовны

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Гены факторов патогенности как молекулярный маркер для определения этиологической значимости условно-патогенных *Enterobacteriaceae*».

Рассматриваемая проблематика действительно актуальна и представляет научный интерес, поскольку острые кишечные инфекции, вызванные условно – патогенными энтеробактериями, характеризуются широким распространением, тяжестью течения, повышением лекарственной резистентности возбудителей, изменением этиологической структуры и степени вирулентности указанных энтеробактерий.

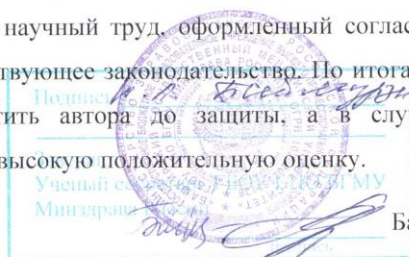
Научная новизна и практическая значимость этой дипломной работы обусловлена молекулярно-генетическими методами, в том числе типирование микроорганизмов и получение новых эпидемиологических данных.

Структура диплома образована введением, литературным обзором, описанием объектов и методов исследований, представлением собственных данных и их обсуждениями, заключением, выводами, списком цитируемой литературы, приложениями. Такой способ структурирования распространён в научной практике и является удобным для восприятия.

Во введении четко сформулированы цели и задачи, описан объект исследования, ясно показаны актуальность, научная новизна и практическая значимость результатов исследования. В главах, посвященных результатам исследования, подробно изложены основные итоги проведенной работы. Литературный обзор достаточно широко освещает состояние изучаемой проблемы.

В целом дипломная работа студентки Мурзиной К.А. представляет собой законченный структурированный научный труд, оформленный согласно существующим нормативам и учитывающий действующее законодательство. По итогам предварительной оценки считаю нужным допустить автора до защиты, а в случае успешного ее прохождения поставить за проект высокую положительную оценку.

с.н. ЦНИЛ к.б.н.



Баймурзина Ю.Л.

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения медико-профилактического факультета
с отделением микробиологии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Мурзиной Марины Альбертовны

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Гены факторов патогенности как молекулярный маркер для определения этиологической значимости условно-патогенных *Enterobacteriaceae*».

В дипломной работе рассматривается одна из актуальных проблем на сегодняшний день – острые кишечные инфекции у детей. Дано обоснование актуальности исследуемой темы диплома. Обработано большое количество научного материала, на высоком теоретическом и методологическом уровне. Материал в дипломной работе изложен с соблюдением внутренней логики, между разделами существует логическая взаимосвязь и написан научным стилем изложения. Освещены подходы изучения отечественных и зарубежных ученых по вопросу идентификации энтеробактерий. Проанализированы факторы, особенности течения болезни и пути заражения острыми кишечными инфекциями.

В практической части дипломной работы представлена поэтапная программа изучения заданных целей. Разработаны тест-системы для видовой идентификации и определения этиологической роли *Enterobacteriaceae* в развитии острых кишечных инфекций. Использованный практический материал достоверен, сделанные выводы обоснованы. Полностью раскрыта тема дипломной работы, достигнуты поставленные цели, решены поставленные задачи. Подробно изложены основные выводы, проведенной работы. Прослеживается тщательная работа по каждому разделу рассматриваемой темы.

Дипломная работа Мурзиной К.А. выполнена в соответствии с требованиями ГОСТа. Она актуальна, полна, качественна. Рекомендую данную работу к защите и считаю, что она заслуживает положительной оценки.

С.н.с. лаборатории молекулярной генетики человека

ИБГ УНЦ РАН, д.б.н., доц.

 А.С. Карунас

