

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

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

Мусавирова Альбина Альбертовна

**МОЛЕКУЛЯРНО – ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА
УРОПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ**

Научный руководитель:
д.б.н.

Б. Р. Кулуев

Уфа – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень условных обозначений (сокращений).....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1. Роль энтеробактерий в развитии инфекций мочевыводящих путей.....	7
1.2. Классификация ИМП. Этиология, патогенез и клиника.....	12
1.3. Общая характеристика энтеробактерий и их уропатогенные свойства.....	21
1.3.1. Род <i>Escherichia</i>	22
1.3.2. Род <i>Proteus</i>	24
1.3.3. Род <i>Klebsiella</i>	25
1.4. Диагностика инфекций, вызванных уропатогенными энтеробактериями.....	28
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	32
2.1. Выделение бактериальной ДНК.....	32
2.2. Подбор олигонуклеотидных праймеров.....	33
2.3. Амплификация участков ДНК геномов микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции.....	34
2.4. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле.....	37
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
3.1. Идентификация энтеробактерий молекулярно – генетическими методами.....	39
3.2. Анализ представленности уропатогенных <i>Enterobacteriaceae</i> в исследуемом клиническом материале.....	48
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	54
ВЫВОДЫ.....	55
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	56

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГЗТ – гормонозаместительная терапия

ИМП – инфекции мочевыводящих путей

МВП – мочевыводящие пути

МКБ – мочекаменная болезнь

МПА – мясо – пептонный агар

ОКЗ – острое кишечное заболевание

ОНМК – острые нарушения мозгового кровообращения

ОРЗ – острое респираторное заболевание

ОКЗ – острое кишечное заболевание

ОИМП – осложненные инфекции мочевыводящих путей

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РСК – реакция связывания комплемента

СПМ – средняя порция мочи

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

УПМ – условно – патогенные микроорганизмы

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные инфекции являются наиболее частыми заболеваниями человека на протяжении всей его жизни. В течение тысячелетий инфекции были основной причиной смерти. К бактериальным инфекциям принадлежат и инфекции мочевыводящих путей (ИМП). Среди всех заболеваний мочевыводящих путей инфекционно - воспалительные болезни занимают первое место и имеют высокий удельный вес (60-70%), как среди городского, так и сельского населения [Кузнецова О.П., 1996; Скрыбин Г. Н., 2006].

В различных регионах земного шара на ИМП приходится 2 - 6% обращений к семейным врачам. В общей структуре заболеваемости населения Российской Федерации, болезни мочеполовой системы к концу 90-х годов составили 7 - 10%, то есть прирост урологической заболеваемости составил почти 50% [Лопаткин Н.А., 2004].

Ежегодно инфекции мочевыводящих путей (ИМП) поражают около 150 миллионов человек в мире. Одной из наиболее частых причин урогенитальной патологии являются условно - патогенные микроорганизмы из семейства *Enterobacteriaceae* [Нисевич Н.И., 1995].

Мочеполовая система не является оптимальной для большинства микроорганизмов ввиду непостоянства рН, осмотического давления, ограниченного набора питательных веществ и других неблагоприятных факторов. Тем не менее, уропатогенные микробы успешно выживают в неблагоприятных условиях мочевыводящих путей. Кроме того, продолжительность антимикробной терапии при ИМП способствует возникновению микробных штаммов с повышенной лекарственной резистентностью [Farmer J.J., 1985; Гребельная Н.В., 2004].

ИМП, вызванные условно - патогенными энтеробактериями, остаются актуальной проблемой, поскольку эти инфекции характеризуются широким распространением, тяжестью течения,

повышением лекарственной резистентности возбудителей, изменением этиологической структуры и степени вирулентности указанных энтеробактерий. Невзирая на клиническую важность уропатогенных энтеробактерий, эти микроорганизмы недостаточно изучены на сегодня. Одной из причин этого являются методические сложности с выделением и характеристикой уропатогенных микроорганизмов. В связи с этим, определённую научную перспективу могут иметь молекулярно-генетические методы, в том числе типирование микроорганизмов и получение новых эпидемиологических данных [Foxman B. B., 2002; Chan J.F., 2015].

Объектом **исследования были** образцы клинического материала (моча), выделенные от 94 больных, страдающими мочекаменной болезнью и инфекциями мочевыводящих путей.

Исходя из актуальности и практической значимости проблемы изучения уропатогенных энтеробактерий **целью** работы являлась молекулярно - генетическая характеристика видового состава микробиоты при различных инфекционных заболеваниях мочевыводящих путей и оценка роли в этом процессе условно - патогенных энтеробактерий.

Для достижения цели работы были сформулированы следующие **задачи**:

1. Сбор клинического материала от пациентов с различными клиническими формами урогенитальной патологии.
2. Выделение и очистка тотальной ДНК из клинического материала.
3. Проведение ПЦР - анализа выделенной ДНК для их видовой идентификации.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Роль энтеробактерий в развитии инфекций мочевыводящих путей

Урологические заболевания являются серьезной социальной, медицинской и экономической проблемой. Они являются одними из причин снижения качества жизни, инвалидизации и преждевременной смертности населения. Высокая заболеваемость обуславливает не только медицинскую, но и социально - экономическую значимость этой проблемы, а также необходимость совершенствования диагностики и методов их лечения.

Еще Р.Р. Вреден в 1893 году в опубликованном классическом труде «К этиологии цистита» указывал, что инфекция является необходимым фактором для возникновения ИМП, и в частности цистита, при условии наличия ряда дополнительных, благоприятных моментов. Развитие ИМП – есть результат преобладания вирулентности этиологического инфекционного фактора над защитными механизмами мочевыводящей системы. Для возникновения ИМП недостаточно присутствия инфекционного возбудителя – необходимо наличие структурных, морфологических и функциональных изменений в органах мочевыводящей системы [Mecsas J. T., 1996; Глыбочко П. В., 2004; Скрыбин Г. Н., 2006].

ИМП являются одной из основных причин образования камней в любом отделе мочевыделительной системы. Мочекаменная болезнь является одним из широко распространенных урологических заболеваний, нередко склонных к тяжелому течению и рецидивам. Она встречается не менее чем у 1 - 3 % населения, причем наиболее часто в возрасте 20 - 50 лет. Больные составляют 30 - 40 % всего контингента урологических стационаров [Немцов В. И., 2008].

Эндемичность мочекаменной болезни, медицинская география обусловлены этиологией и патогенезом этого заболевания. Среди

этиологических факторов камнеобразования, относящихся к каузальному генезу: А - авитаминоз, повышенное образование эндогенного витамина D или его недостаточность в организме, щелочеобразующая инфекция, первичный гиперпаратиреозидизм (коралловидный и двусторонний нефролитиаз), генетическая предрасположенность к мочекаменным диатезам [Глыбочко П. В., 2004]. Патогенетические факторы (формальный генез) являются предрасполагающими, но и они играют значительную роль в камнеобразовании. В большей степени это различные виды нарушения оттока мочи, в меньшей степени — гиподинамия, атония мочевых путей и др. [Тиктинский О.Л., 2000].

Доминирующими в образовании мочевых камней являются причины местного характера: инфекции мочевых путей, анатомические дефекты и другие патологические изменения в их верхних отделах, приводящие к нарушению нормального оттока мочи, метаболические и сосудистые расстройства. Основным и довлеющим над другими факторами развития нефролитиаза является нарушение оттока мочи, обусловленное неполной обструкцией и нарушением уродинамики нейрогенного происхождения [Пытель А. Я., 1968]. Роль нарушения оттока мочи наиболее велика при развитии рецидивов. После оперативных вмешательств на почках, вследствие затеков мочи образуются сращения, рубцы в паранефральной и парауретральной клетчатке, приводящие к нарушению уро -, а иногда и гемодинамики. Инфекция и бактериальное поражение относится к общим этиологическим факторам нефролитиаза [Пытель Ю. А., 1987].

Распространенность мочекаменной болезни прогрессивно увеличивается, что отображается в увеличении числа пациентов, страдающих МКБ. В 2000 году заболеваемость МКБ составляла 523,2 человека на 100000 населения. В 2002 году в России заболеваемость МКБ составила 535,8 на 100 000 населения [Лопаткин Н.А., 1990; Дадабаева Р.К., 2000]. МКБ занимает одно из первых мест среди

урологических заболеваний, составляя в среднем по России 34,2 %. Больные составляют 30 - 40 % всего контингента урологических стационаров. У большинства пациентов МКБ выявляется в наиболее трудоспособном возрасте 30 - 50 лет [Трапезникова М.Ф., 1998; Досаева Л.А., 2004].

ИМП связаны с развитием в мочевыделительной системе воспалительного процесса. Инфицирование мочевого пузыря является только предпосылкой к воспалению, развитие же воспалительного процесса происходит при нарушении структуры и функции органа. Так, слизистая оболочка мочевого пузыря имеет множество механизмов, защищающих ее от проникновения инфекции. К ним относятся фагоцитарная активность слизистой мочевого пузыря, гидродинамическая защита, ночное концентрирование мочи, антиадгезивное действие мукополисахаридного слоя уротелия, выработка слизи периуретральными железами с бактерицидными свойствами, высокая осмолярность мочи, слущивание эпителиальных клеток мочевого пузыря, антибактериальная активность некоторых ингредиентов мочи [Ismaili A. A., 1996; Жабченко И.А., 2013].

Мочевой пузырь очищается от микрофлоры путем регулярного смывания и удаления с мочой. Естественным барьером для проникновения микроорганизмов из мочеиспускательного канала в мочевой пузырь является регулярное, достаточно интенсивное его опорожнение при скорости движения мочевого потока по уретре, равной 180–310 см/сек, чем достигается быстрое механическое очищение уретры от бактериальной флоры [Перепанова Т.С., 1996].

Микроорганизмы могут попадать в мочевыводящие пути гематогенным или лимфогенным путем, однако согласно многочисленным клиническим и экспериментальным данным, ИМП чаще всего развиваются при восходящем распространении бактерий из уретры, особенно микроорганизмов кишечной группы (*Escherichia coli* и другие

представители семейства *Enterobacteriaceae*). Это является логическим объяснением более высокой частоты ИМП у женщин, по сравнению с мужчинами, и повышенного риска развития ИМП после катетеризации или инструментальных вмешательств на мочевом пузыре. Однократная катетеризация мочевого пузыря у амбулаторных пациентов приводит к развитию ИМП в 1 - 2 % случаев. Постоянный катетер с открытой дренажной системой уже в течение первых 3 - 4 дней практически в 100% случаев приводит к развитию бактериурии. Использование закрытой дренажной системы, в том числе с клапаном, предотвращающим обратный ток мочи, несколько замедляет, но в конечном счете не предотвращает развитие инфекции. Считается, что в этом случае бактерии проникают в мочевой пузырь через слизисто – гнойное пространство между катетером и стенкой уретры, что приводит к развитию бактериурии практически у всех пациентов в течение первых четырех недель [Лопаткин Н.А., 1996; Grabe M. G., 2011].

В патогенезе ИМП ключевую роль играет взаимодействие факторов, связанных с больным и с возбудителем. К первой группе относятся нарушения оттока мочи, вызванные врожденными аномалиями, камнями, доброкачественной гиперплазией простаты, стриктурами уретры, неврологическими заболеваниями и т.д., а также поражение иммунитета, имеющее место, например, у больных СПИДом, пациентов после трансплантации и других групп больных. Большое значение в развитии осложненных ИМП играют инородные тела, находящиеся в мочевыводящих путях, катетеры и стенты, которые подвергаются колонизации патогенными микроорганизмами, способствуя развитию инфекционно – воспалительного процесса [Рябов С.И., 1997; Yoshida O. O., 1999].

Существует ряд факторов риска развития ИМП (табл. 1) [Дзеранов Н.К., 2002].

Таблица 1. Факторы риска развития ИМП

Возраст	Женщины		Мужчины	
	Частота, %	Фактор риска	Частота, %	Фактор риска
<1 года	1	Анатомические и функциональные нарушения	1	Анатомические и функциональные нарушения
1-5 лет	4-5	Врожденная патология, пузырно-мочеточниковый рефлюкс	0,5	Врожденная патология, необрезанная крайняя плоть
6-15 лет	4-5	Пузырно-мочеточниковый рефлюкс	0,5	-
16-35 лет	20	Половая жизнь	0,5	Гомосексуализм
36-65 лет	35	Гинекологические операции, пролапс гениталий и мочевого пузыря	20	ДГПЖ, инфравезикальная обструкция, операции, частые катетеризации
>65 лет	40	Гинекологические операции, пролапс гениталий и мочевого пузыря + недержание мочи и частые катетеризации	35	ДГПЖ, инфравезикальная обструкция, операции, частые катетеризации + недержание мочи и длительные катетеризации

Наиболее важным возбудителем неосложненных ИМП продолжает оставаться *Escherichia coli*, выявляемая примерно в 80 % случаев заболеваний [Stamm W.E., 1993]. Значительно реже неосложненные ИМП вызывают *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Proteus* spp., а также *Enterococci*. Что же касается осложненных ИМП, то причиной их развития нередко являются бактерии, крайне редко встречающиеся при неосложненных формах, такие как *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus mirabilis*, а также стрептококки группы В. Кроме того, при осложненных ИМП нередко выявляется смешанная инфекция [Smith P.W., 2000].

Концепция вирулентности/патогенности бактерий в отношении МВП подразумевает, что не все виды микроорганизмов в одинаковой степени способны вызывать инфекционный процесс. Чем более компрометированы естественные защитные механизмы макроорганизма (например, при обструкции МВП или катетеризации мочевого пузыря), тем меньшая вирулентность требуется для того, чтобы бактериальный штамм привел к развитию инфекции. Это подтверждается данными *in vitro* наблюдений, когда у бактерий, выделенных от пациентов с осложненными ИМП, часто не обнаруживали факторы вирулентности. Концепция вирулентности бактерий также предполагает, что некоторые штаммы бактерий в пределах одного вида обладают особыми факторами вирулентности (например, пили различных типов). Они облегчают их проникновение восходящим путем из кишечника, преддверия влагалища или периуретральной области в уретру и затем в мочевой пузырь, или в почки с последующим развитием системного воспаления [Маянский А.Н., 1999; Grabe M. G., 2011].

Судьба проникших в мочеполовую систему УПМ зависит от их инфицирующей дозы и состояния иммунитета. Категориями риска развития инфекции мочевыводящих путей являются больные с врожденными пороками развития мочеполовой системы, почечнокаменной болезнью, нарушениями проводимости спинного мозга, гнойно – воспалительными заболеваниями органов малого таза, хирургическими вмешательствами на мочеполовой системе, в том числе с пересаженной почкой. При инструментальных исследованиях мочеполовой системы, диабете и других общих заболеваниях, сопровождающихся иммунодефицитом или иммунодепрессивной терапией [Воробьев А.А., 2004].

Таким образом, в защите макроорганизма от патогенного воздействия уропатогенных энтеробактерий основную роль выполняет иммунная система в кооперации с ассоциированной с ней физиологической микрофлорой. Любое ослабление иммунитета или

нарушение целостности эпителия повышает риск развития урологических инфекций.

1.2. Классификация ИМП. Этиология, патогенез и клиника

Клиническая классификация ИМП:

1. Бессимптомная бактериурия;
2. Симптоматическая ИМП:
 - А. Уретрит (специфический, неспецифический);
 - Б. Цистит (острый, рецидивирующий, хронический, геморрагический);
 - В. Простатит (специфический, неспецифический, острый, хронический);
 - Г. Пиелит и пиелонефрит [Калугина Г.В., 1993].

Уретрит

Уретрит – заболевание, при котором происходит воспаление мочеиспускательного канала из-за различных поражений цилиндрического эпителия. Природа воспаления может быть инфекционной (в том числе гонококковой, которая рассматривается в структуре венерических, а не урологических заболеваний) и неинфекционной. Подавляющее большинство негонококковых (или неспецифических) уретритов – 95-97% – вызываются возбудителями, передающимися половым путем (ЗППП) [Коротяев А.И., 1998].

3-5 % в общей структуре заболевания имеют уретриты, вызванные нисходящей инфекцией (из предстательной железы, почек, мочевого пузыря) и не инфекционного характера. Последние возникают в результате действия механических, химических, физических факторов, влияния аллергенов.

Патогенетические механизмы возникновения неспецифического воспаления мочеиспускательного канала:

- 1) Половой. Во время коитуса происходит прямой контакт мембран слизистых оболочек и передача инфекции.
- 2) Эндогенный. Передача инфекции из других органов мочеполовой системы лимфогенным и гематогенным путем, а также раздражение слизистых внешними негативными факторами.
- 3) Перинатальный. Инфицирование ребенка может происходить в процессе рождения при продвижении через родовые пути матери [Прозоркина Н.В., 2002].

Механизм развития воспалительного процесса в уретре определяется состоянием ее слизистой. Противомикробная резистентность слизистой мочеиспускательного канала (уровень местного иммунитета) зависит от ее механической целостности (предотвращающей проникновение микроорганизмов с поверхности), выработки достаточного количества слизи клетками секреторного эпителия, пара- и бульбоуретральными железами (которая обеспечивает механическое смывание микроорганизмов с поверхности уретры) и определенным биохимическим составом уретральной слизи, оказывающей непосредственное противомикробное действие (иммуноглобулины, комплемент и его компоненты, лизоцим и др.). При нарушении целостности слизистой в зоне поражения развивается воспалительная реакция, происходит внедрение микроорганизмов и развитие патологического процесса. При этом повышается проницаемость стенки мочеиспускательного канала и лейкоциты (клеточные факторы противомикробной защиты) начинают проникать и скапливаться в просвете уретры [Татарина С. Д., 1984; Литвин В. Ю., 1997].

Степень активности воспалительного процесса определяется как первично - травмирующим фактором, так и "агрессивностью" микрофлоры, вызывающей и поддерживающей воспалительный процесс. Заболевание может начинаться остро и переходить в хроническое

рецидивирующее течение, а может и изначально иметь хроническое субклиническое течение и выявляться только при лабораторном обследовании [Henderson В. Е., 1996].

Острый уретрит характеризуется наличием обильных мутных, желто-белых или желтых (гнойных) выделений, резью, зудом, неприятными ощущениями по ходу уретры, значительно усиливающимися при мочеиспускании. При осмотре губки уретры гиперемированы, отечны, пальпация мочеиспускательного канала болезненная, первая порция мочи мутная, может содержать в себе нити слизи с элементами гнояного содержимого. При поражении задней уретры (предстательной и внутрипузырной ее части) нередко присоединяется учащенное мочеиспускание (из-за нарушения функции сфинктера мочевого пузыря). При микробной этиологии острого уретрита инкубационный период, обычно, составляет 2 - 5 дней, однако может быть 7 дней и более [Мельников В.В., 1999].

Хроническое течение воспалительного процесса в уретре отличается более стертой картиной (незначительные выделения чаще по утрам, небольшой зуд, резь в уретре, слегка усиливающиеся при мочеиспускании и т. д.). Процесс может активироваться после половых контактов, приема алкоголя и др. с постепенным возвратом к исходному состоянию. При первично - хроническом течении заболевания точное время инфицирования определить практически невозможно. Длительное протекание воспалительного процесса в мочеиспускательном канале часто приводит к внедрению микроорганизмов в предстательную железу и семенные пузырьки с развитием хронического простатита и везикулита [Парфенова Т.В., 2014].

Цистит

Цистит – воспаление мочевого пузыря, характеризующееся воспалительными изменениями слизистой оболочки, нарушением функции мочевого пузыря и изменениями осадка мочи [Перепанова Т.С., 1996].

Наиболее частыми возбудителями цистита являются грамотрицательные энтеробактерии (в основном *Escherichia coli*) и коагулазонегативные стафилококки [Stamm W.E., 1993]. В результате проведенного в России многоцентрового исследования было выявлено, что в 80 % случаев острый цистит вызывает кишечная палочка *Escherichia coli*, в 8,2 % — *Proteus* spp., в 3,7 % — *Klebsiella* spp., в 3 % — *Staphylococcus saprophyticus*, в 2,2 % — *Enterobacter* spp., в 0,7 % — *Pseudomonas aeruginosa* и др. [Clarke S.C., 2003].

Нисходящий путь проникновения инфекции в мочевой пузырь обычно отмечается при воспалительном процессе в почках (хронический пиелонефрит, пионефроз). Цистит при длительно существующем хроническом пиелонефрите наблюдается сравнительно редко, главным образом у больных, у которых он протекает в активной фазе, т. е. сопровождается значительной бактериурией. Гематогенный путь инфицирования мочевого пузыря устанавливаются при возникновении цистита вскоре после инфекционных заболеваний или при наличии отдаленного гнойного очага в организме. У женщин существует прямая лимфатическая связь между мочевым пузырем и половыми органами, поэтому при воспалительном процессе в последних (сальпингоофорит, эндометрит, параметрит и др.) инфекция может проникать в мочевой пузырь лимфогенно. Многочисленными экспериментальными и клиническими наблюдениями доказано, что слизистая оболочка мочевого пузыря обладает значительной устойчивостью к инфекции, поэтому для возникновения цистита, помимо наличия патогенной микрофлоры, необходимы дополнительные предрасполагающие факторы. Наиболее существенными из них являются: нарушения кровообращения в стенке мочевого пузыря и малого таза, нарушения опорожнения мочевого пузыря, снижение сопротивляемости организма инфекции (гиповитаминоз, переохлаждение, переутомление и др.), неблагоприятное воздействие на стенку мочевого пузыря химических веществ и ядов, выделяющихся с

мочой, а также радиационной терапии [Yagisawa T. A., 2001; Широбоков В.П., 2010].

Воспаление мочевого пузыря может развиваться внезапно, но чаще всего явления цистита нарастают постепенно. Он проявляется чувством дискомфорта, ощущением жжения и зуда в области уретры и промежности во время мочеиспускания. Ощущение дискомфорта и боли над лобком или в области промежности могут оставаться и после мочеиспускания. Мочеиспускания становятся частыми, болезненными, количество мочи при каждом мочеиспускании уменьшается. В конце акта мочеиспускания иногда моча окрашивается кровью. Позывы на мочеиспускание могут быть императивными, иногда наблюдается недержание мочи. В большинстве случаев при остром цистите температура тела остается нормальной, редко бывает субфебрильной. Повышение температуры при цистите свидетельствует о том, что инфекция распространилась за пределы мочевого пузыря, чаще всего на верхние мочевые пути. Пальпация и перкуссия в надлобковой области при цистите иногда сопровождаются болезненностью. Напряжение мышц передней брюшной стенки наблюдается главным образом у детей. Моча при остром цистите содержит много лейкоцитов и эритроцитов, что обуславливает наличие в ней небольших количеств белка. Бактериурия всегда выявляется при инфекционном цистите. Как и при других формах инфекции мочевых путей, при цистите важно определить степень бактериурии [Brandsch M. A., 1995; Перепанова Т.С., 1996].

Обнаружение в 1 мл мочи более 100000 микробных тел свидетельствует об остром процессе. При цистите в крови определяются лишь умеренный лейкоцитоз и повышенная СОЭ [Crotchfelt K. A., 1997].

Простатит

Простатит - это воспаление предстательной железы, наиболее часто развивающееся у мужчин в возрасте 25 – 45 лет.

Бактериальный простатит (острый и хронический) в большинстве случаев вызван бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, в частности кишечной палочкой (*E. coli*). Роль так называемых атипических микроорганизмов (хламидий, уреаплазм, микоплазм) в развитии простатита на сегодняшний день не может считаться доказанной. У больных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) этиологическими возбудителями могут также быть дрожжевые грибы (*Candida spp.*) и микобактерии туберкулеза [Нисевич Н.И., 1995; Grado M. D., 2001].

Выделяют три основных пути инфицирования предстательной железы:

- уриногенный (восходящий), т.е. входными воротами является уретра;
- лимфогенный: инфекция из соседних органов малого таза может проникать в простату вследствие воспаления прямой кишки (проктит) или мочевого пузыря (цистит), а также из инфицированных геморроидальных вен;
- гематогенный (через кровь): обусловлен наличием в организме очагов хронической инфекции (тонзиллиты, кариозные зубы) или осложнениями острых инфекций (гриппа, ОРЗ, ангины и т.п.) [Лопаткин Н.А., 1990].

При остром простатите у больных отмечается учащенное, болезненное, а иногда затрудненное мочеиспускание, сильные боли в промежности, паху, за и над лобком, отдающие в задний проход и головку полового члена, болезненность при дефекации. В тяжелых случаях бывает острая задержка мочи. Практически всегда имеет место общая реакция организма, проявляющаяся плохим самочувствием, повышением температуры тела до 38–39°C, потливостью, слабостью, в силу чего больные нуждаются в госпитализации по экстренным показаниям.

Однако значительно чаще простатит развивается в хронической форме. Иногда в течение нескольких лет с момента проникновения в простату инфекция себя не проявляет, и заболевание протекает в

латентной форме. И только после определенных провоцирующих ситуаций, таких как длительное или резкое переохлаждение, перенесенные соматические заболевания (грипп, простуда и др.), эксцессы в сексуальной жизни, заболевание проявляется клинически. В этих случаях спектр жалоб больных хроническим простатитом необычайно широк: от незначительных нарушений половой функции до глубоких нервно - психических расстройств [Коротяев А.И., 1998].

Хронический простатит проявляется, как правило, ноющими болями в промежности, распространяющимися на наружные половые органы, в область лобка или крестца (более выраженные в покое), болезненным и учащенным мочеиспусканием (особенно в ночное время). Могут быть незначительные выделения из мочеиспускательного канала при дефекации, ухудшение половой функции (ослабление эрекции, укорочение полового акта, снижение остроты сексуальных ощущений), периодическое повышение температуры тела до 37°C. Перечисленные симптомы могут наблюдаться как одновременно, так и в различных сочетаниях [Ueno A. O., 1977; Татарина С. Д., 1984].

Пиелонефрит

Пиелонефрит - неспецифическое микробно - воспалительное заболевание одной или обеих почек, характеризующееся преимущественным поражением тубулоинтерстициальной ткани почек и чашечно-лоханочных систем. У детей пиелонефрит занимает второе место после заболеваний органов дыхания. У женщин молодого, среднего возраста и у девочек острый неосложнённый пиелонефрит встречается в 5 раз чаще, чем у мужчин и мальчиков [Пытель А. Я., 1968].

Возбудителями инфекционного пиелонефрита в первую очередь служат грамотрицательные или грамположительные бактерии, обычно вызывающие инфекцию мочевых путей (бактериальный пиелонефрит).

Другими возможными возбудителями пиелонефрита могут быть *Mycobacterium tuberculosis* (почечный туберкулез), дрожжевые грибки (кандидозный пиелонефрит), другие грибки и вирусы. Высокий риск возникновения тяжелой инфекции почек существует у пациентов с обструкцией и нейрогенными аномалиями мочевых путей, сахарным диабетом, поликистозом почек, камнями и функционирующими мочевыми катетерами. Инфекция, вызываемая уреазопродуцирующими микроорганизмами, приводит к образованию инфекционных (струвитных) камней. У пациентов с сахарным диабетом повышен риск развития гнойных форм заболевания: апостематозного и эмфизематозного пиелонефрита, карбункула и абсцесса почки, папиллярного некроза. У пациентов с длительно сохраняющейся, осложненной инфекцией может возникнуть редкое состояние, известное как ксантогранулематозный пиелонефрит [Петровская В.Г., 1994].

Развитие бактериального пиелонефрита, безусловно, начинается с внедрения бактерий в мочевые пути. Дальнейшее течение процесса определяется вирулентностью микроорганизма, состоянием общих и местных защитных механизмов макроорганизма, его восприимчивостью к инфекциям мочевых путей. Известно 3 пути проникновения патогенных микроорганизмов в мочевые пути: восходящий (заселение бактериями кишечной группы наружного отверстия мочеиспускательного канала, откуда они проникают в мочеиспускательный канал и мочевой пузырь); гематогенный (например, отсев возбудителя в почки с образованием – абсцесса при стафилококковой бактериемии); контактный (распространение микроорганизмов из соседних органов, – например, при пузырно-кишечном свище, формировании мочевого пузыря из сегмента кишки) [Рябов С.И., 1997].

Течение пиелонефрита и риск осложнений определяются первичным или вторичным характером инфекции. Первичный (неосложненный) пиелонефрит хорошо поддается антибактериальной терапии и не приводит

к повреждению почки. Тяжелое течение первичного пиелонефрита может привести к сморщиванию коркового вещества, однако отдаленное влияние этого осложнения на функцию почек неизвестно. При вторичных инфекциях поражения паренхимы почек более тяжелое, имеется высокая вероятность развития деструктивных процессов в почке и околопочечном пространстве (абсцесс, паранефрит) [Yagisawa T. I., 2001; Широбоков В.П., 2010].

При остром неосложненном пиелонефрите локальные признаки могут быть выражены слабо. Состояние больного средней тяжести или тяжелое. Больные жалуются на недомогание, общую слабость, повышение температуры тела до 39 - 40°C, озноб, потливость, боли в боку или в поясничной области, тошноту, рвоту, головную боль, учащенное мочеиспускание. При осмотре наблюдается покраснение лица, тахикардия, а пальпация и поколачивание в реберно-позвоночном углу на стороне поражения болезненны. При остром неосложненном пиелонефрите, как правило, отмечается нормальное артериальное давление (АД). В 10 – 15 % случаев возможна микро- или макрогематурия. В тяжелых случаях развивается уросепсис, вызванный грамотрицательными бактериями (бактериемия выявляется у 20 % больных), некроз почечных сосочков, острая почечная недостаточность с олигурией или анурией, абсцесс почки, паранефрит. При вторичном осложненном пиелонефрите, в том числе у госпитализированных пациентов и больных с постоянными мочевыми катетерами, клиническая симптоматика колеблется от бессимптомной бактериурии до тяжелого уросепсиса и инфекционно - токсического шока. Ухудшение состояния может начаться с резкого усиления болей в поясничной области или приступа почечной колики вследствие нарушения оттока мочи из лоханки почки. Характерна гектическая лихорадка, когда гипертермия до 39 - 40°C сменяется критическим падением температуры тела до субфебрильных цифр с проливным потом и постепенным снижением интенсивности болей, вплоть до полного исчезновения. Однако

если препятствие оттоку мочи не устранено, состояние больного вновь ухудшается, усиливаются боли в области почек и повторно возникает лихорадка с ознобом. Выраженность клинической картины заболевания варьирует в зависимости от возраста, пола, предшествующего состояния почек и мочевыводящих путей, наличия госпитализаций до настоящего поступления [Глыбочко П. В., 2004; Досаева Л.А., 2004; Борисов Л.Б., 2005].

1.3. Общая характеристика энтеробактерий и их уропатогенные свойства

Семейство *Enterobacteriaceae* включает 30 родов и более 100 видов: *Arsenophonus*, *Budvicia*, *Buttiarella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclerica*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Tatumella*, *Xenorabdus*, *Yersinia*, *Yokenella* [Мельников В.В., 1999]. Роды *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* являются безусловно - патогенными микроорганизмами – «классическими» патогенами, остальные представители семейства – условно - патогенными [Finlay В.В., 1989].

По данным американских исследователей более 99 % всех энтеробактерий, выделенных из клинического материала, принадлежат к 23 видам, причем, наиболее часто (в 80–95 % случаев) выделяют *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* [Farmer J.J., 1985].

Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* являются наиболее частыми возбудителями ИМП. Их объединяет ряд общих признаков. Это короткие, не образующие спор, палочки с закругленными концами, подвижные (перитрихи) или неподвижные, некоторые имеют капсулы. Аэробы или факультативные анаэробы. Характерна отрицательная окраска по Граму. Хорошо растут на обычных питательных средах с мясным экстрактом. На

большинстве плотных сред энтеробактерии образуют круглые выпуклые блестящие S- (гладкие) колонии, а также часто обусловленные потерей капсулы плоские, неровные и зернистые R- (шероховатые) формы. Для них характерна ферментация глюкозы (и других углеводов) с образованием кислоты и газа. По отношению к лактозе их делят на лактоза - ферментирующие и лактоза — неферментирующие. Каталаза — положительны, восстанавливают нитраты в нитриты [Davis B.R., 1985; Широбоков В.П., 2010].

1.3.1. Род *Escherichia*

Впервые эшерихии были выделены в 1885 г. Этерихом. Встречается очень много разновидностей кишечных палочек, которые являются нормальными обитателями кишечника человека. Типовой вид рода *Escherichia* — *E. coli* (кишечная палочка), вызывающая при снижении иммунитета гнойно - воспалительные заболевания у человека [Булгаков А.К., 2000].

Морфологические и культуральные свойства: *E. coli* — небольшие (0,5—1 мкм) палочки, спор не образуют, грамотрицательны. Некоторые штаммы образуют капсулу. Имеют жгутики, которые расположены по всей поверхности клетки (перитрих). Факультативный анаэроб, температурный opt — 37°C, рН — 7,2—7,8. *E. coli* к питательным средам не требовательна и хорошо растет на простых средах. На твердых средах образует слегка выпуклые колонии, мутные, слегка желтоватые. *E. coli* обладает большим набором различных ферментов. Наиболее важным отличительным признаком *E. coli* от других представителей семейства является ее способность ферментировать в течение 24 часов лактозу [Andreu A. E., 1997; Бембеева Е.С., 1998].

Резистентность. *E. coli* хорошо сохраняется во внешней среде. При температуре 60°C погибает в течение 15 мин; 1 % раствор лизола или 5 % раствор хлорамина — убивает через 10—15 мин. В отличие от других

энтеробактерий, *E. coli* более устойчива к действию различных факторов [Brandsch M. R., 1995].

Эпидемиология. Как сапрофиты *E. coli* обитают в толстом кишечнике и играют положительную роль: принимают участие в синтезе витаминов группы В; являются антагонистом многих гнилостных бактерий; частично расщепляют клетчатку. В толстом кишечнике обитают *E. coli* серогрупп 02, 07, 09. Но при снижении иммунитета *E. coli* может вызывать различные воспалительные заболевания — эшерихиозы. Источником эшерихиозов являются больные люди, реже животные. Механизм заражения — фекально - оральный, пути передачи — пищевой, контактно - бытовой. Чаще всего заболевание носит характер вспышек [Kuhn M. A., 1994; Булгаков А.К., 2000].

Антигенная структура — *E. coli* имеет О - соматический, Н - жгутиковый и К - капсульный антигены. Каждый из этих антигенов имеет несколько вариантов: О - антиген — 170 вариантов, К - антиген — более 100, Н - антиген — более 50. Строение О - антигена определяет принадлежность к серогруппе. Штаммы *E. coli*, имеющие присущий им набор антигенов, называются серологическими вариантами (серовары) [Nataro J.P., 1998].

По своим токсигенным свойствам различают два варианта *E. coli*: 1) условно-патогенные и 2) патогенные штаммы.

Патогенез поражений. Основными факторами патогенности являются облегчающие адгезию к эпителию и способствующие колонизации нижних отделов тонкой кишки. *E. coli* вырабатывает термолабильный и термостабильный энтеротоксины. Эффект термолабильного токсина аналогичен действию токсина холерного вибриона. Он усиливает перистальтику кишечника, вызывает диарею, повышение температуры тела, рвоту и нарушение водно - солевого обмена [Grado M. D., 2001].

Клинические проявления эшерихиозов при ИМП: сопровождаются бессимптомной бактериурией, циститами и острыми пиелонефритами.

Клинически это проявляется дизурией, частыми позывами на мочеиспускание, болями в нижней части живота, лихорадкой, реже — тошнотой и рвотой. Обычно эти поражения происходят из микрофлоры кишечника. Бактерии проникают в уретру, затем в мочевой пузырь, прикрепляются к поверхности эпителия и активно размножаются. Развитие этих поражений зависит от возраста и пола [Прозоркина Н.В., 2002; Воробьев А.А., 2004].

1.3.2. Род *Proteus*

Типовой вид *P. vulgaris*. Протей впервые был выделен Хаузером в 1885 г. Это грамположительные палочки. В мазках располагаются парно или цепочками, спор и капсул не образуют, подвижны. Капсул не имеют, факультативные анаэробы. Хорошо растет на обычных питательных средах. На МПА образует два вида колоний: в Н - форме колонии имеют вид «роения». Это типичная форма роста (сплошной рост), которая сопровождается неприятным гнилостным запахом. При неблагоприятных условиях (наличие в среде фенола, желчных солей) образует О - формы колоний, с ровными краями. Пигментов не образуют. При росте на жидких средах дают равномерное помутнение [Schauer D.B., 1993; Бембеева Е.С., 1998].

Антигенная структура. У протеев выделяют О-, Н- и К - антигены. Соматический О - антиген термостабилен, Н - антиген — термолабилен. Род *Proteus* состоит из 5 видов: *Pr. vulgaris*, *Pr. mirabilis*, *Pr. morgani* (66 сероваров), *Pr. rettgeri* (45 сероваров), *Pr. inconstans* (156 сероваров). Некоторые из них относят к патогенным бактериям, хотя протей считается условно - патогенным микроорганизмом [Luperchio S.A., 2000].

Резистентность. Во внешней среде протей довольно устойчивы. При 60°C сохраняются около часа. Низкие температуры переносят хорошо. Устойчивы к действию дезрастворов [Nataro J.P., 1998].

Патогенез поражений. Важным фактором патогенности протей является способность к образованию уреазы. Бактерии разлагают мочевины в качестве источника энергии, конечные продукты метаболизма (хлорид аммония) вызывают местное воспаление и способствуют образованию камней и застою мочи. «Роящиеся» бактерии способны к адгезии и паренхиме почечной ткани и эпителию мочевого пузыря. Эти бактерии характеризуются повышенным образованием уреазы и гемолизина. На кровяном агаре гемолитическая активность проявляется через 48 часов [Коротяев А.И., 1998; Donnenberg M.S., 2001].

При снижении защитных сил организма протей вызывают у человека циститы, энтероколиты, воспаление среднего уха, сепсис, послеоперационное нагноение ран и т. д. Иммунитет после перенесенных заболеваний непродолжительный [Немцов В. И., 2008].

Идентификация протеев самая простая во всем семействе *Enterobacteriaceae*. Их легко распознать по способности давать вид «роения» и по гнилостному запаху.

Профилактика протейных заболеваний сводится к соблюдению санитарно - гигиенических правил: защита воды и продуктов питания от загрязнения испражнениями и гнойными выделениями [Прозоркина Н.В., 2002].

1.3.3. Род *Klebsiella*

Название дано в честь Э. Клебса. К роду *Klebsiella* относятся 8 видов: *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella mobilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella singaporensis*, *Klebsiella variicola* [Hendolin P.H., 1997].

Морфология и физиология. Представители вида *Klebsiella pneumoniae* - короткие, толстые, неподвижные граммотрицательные палочки, образующие в отличие от других энтеробактерий выраженные полисахаридные капсулы. Клебсиеллы, так же как и другие

энтеробактерии, не требовательны к питательным средам. Они ферментируют глюкозу с кислотой и газом и используют ее и цитрат в качестве единственного источника углерода, а аммиак - источника азота. Подвиды клебсиелл различают по биохимическим признакам. Дифференциация разных видов клебсиелл проводится на основании их неодинаковой способности ферментировать углеводы, образовывать уреазу и лизиндекарбоксилазу, утилизировать цитрат и других признаков. Клебсиеллы образуют слизистые колонии [Бондаренко В.М., 1999; Picket C.L., 1999].

Антигены. Клебсиеллы содержат О - и К - антигены. Всего известно около 11 О - антигенов и 70 К - антигенов. Последние представлены капсульными полисахаридами. Серологическая идентификация клебсиелл основана на их антигенных различиях. Наибольшее число О - и К - антигенов содержат *K. pneumoniae*. Некоторые О - и К - антигены клебсиелл родственны О - антигенам эшерихий и сальмонелл [Wall I. T., 1990; Vallance B.A., 2003].

Патогенность и патогенез. Вирулентность клебсиелл обусловлена их адгезией, связанной с капсульным полисахаридом, пиллями и белком наружной мембраны, последующим размножением и колонизацией энтероцитов. Капсула также защищает бактерии от действия фагоцитирующих клеток. При разрушении бактериальных клеток освобождается эндотоксин (ЛПС). Клебсиеллы являются возбудителями пневмонии, ОКЗ, риносклеромы, озены. Они также могут вызывать поражения мочеполовых органов, мозговых оболочек взрослых и детей, токсико - септические состояния и ОКЗ у новорожденных. Клебсиеллы могут вызывать внутрибольничные инфекции.

Иммунитет. Клебсиеллы вызывают гуморальный и клеточный иммунный ответ. Однако образующиеся антитела не обладают протективными свойствами. Развитие ГЗТ связано с внутриклеточной локализацией клебсиелл [Бондаренко В. М., 1988].

Экология и эпидемиология. Клебсиеллез является антропонозной инфекцией. Источник инфекции - больные и носители. Заражение происходит через респираторные пути. Клебсиеллы входят в состав кишечного биоценоза, обнаруживаются на коже и слизистых оболочках. Они устойчивы к факторам окружающей среды и сравнительно долго сохраняются в почве, воде, в помещениях. В молочных продуктах выживают и размножаются при хранении их в холодильниках. При нагревании погибают уже при температуре 65°C, чувствительны к растворам обычных дезинфектантов [Нисевич Н.И., 1995; Гашимова Д. Т., 1998].

Лабораторная диагностика. Диагноз основывается на результатах микроскопии мазков из исследуемого материала (мокрота, слизь из носа и др.) и выделении чистой культуры возбудителя. Дифференцировка клебсиелл и их идентификация проводится по морфологическим, биохимическим и антигенным признакам. Серодиагностику проводят в РСК с сыворотками больных и О - антигеном клебсиелл [Volmer M.V., 2001; Борисов Л.Б., 2005].

Таким образом, семейство энтеробактерий включает большое число представителей нормальной микрофлоры человеческого организма и, в то же время, значительное количество патогенных микробов. Систематика этого рода неоднозначна и его представители недостаточно изучены на сегодня. Тем не менее, подробное изучение энтеробактерий очень важно, поскольку они задействованы в патогенезе многих заболеваний, в том числе и ИМП.

1.4. Диагностика инфекций, вызванных уропатогенными энтеробактериями

Бактериологическому исследованию на наличие энтеробактерий может быть подвергнут различный материал, получаемый от людей;

показания к его исследованию, правила взятия, подготовки к посеву и выбор питательных сред различны.

Общим требованием к процедуре отбора проб клинических материалов является обеспечение условий, исключающих контаминацию (загрязнение) материала микроорганизмами из смежных областей тела и окружающей среды. Материал для бактериологического исследования целесообразно брать до начала антибиотико - (химио -)терапии [Татарина С. Д., 1984].

Для диагностики ИМП важно определить количество бактерий, обнаруженных в МВП. В 1960 г. при изучении пиелонефрита у беременных женщин Kass предложил концепцию «значимой» бактериурии ($>10^5$ КОЕ/мл) [Kass E. H., 1960]. Хотя эта концентрация привела к использованию количественных микробиологических методов в диагностике инфекционных заболеваний и, по – прежнему, в целом сохраняет свою значимость, в последнее время стало очевидно, что не существует фиксированного бактериального числа, которое показывает «значимую» бактериурию и которое можно было бы применить ко всем ИМП во всех ситуациях [Farmer J.J., 1985; Grabe M. G., 2011].

Клинически значимыми являются следующие показатели бактериурии:

- $>10^3$ КОЕ уропатогена/мл в средней порции мочи (СПМ) при остром неосложненном цистите у женщин;
- $>10^4$ КОЕ уропатогена/мл в СПМ при остром неосложненном пиелонефрите у женщин;
- $>10^5$ КОЕ уропатогена/мл в СПМ у женщин или $>10^4$ КОЕ уропатогена/мл в СПМ у мужчин или в моче у женщин, полученной с помощью катетера, при осложненной ИМП [Livrelli C. D., 1996; Foxman B. V., 2002].

Наличие ИМП определяется по клиническим симптомам и результатам лабораторной диагностики. В качестве диагностических

методов ИМП используются проточная цитометрия, микроскопия с окрашиванием по Граму, а также микробиологические методы исследования мочи. Посев мочи на наличие бактерий является референсным методом исследования, он позволяет провести качественное и количественное исследование состава микрофлоры, а также чувствительности микроорганизма к антибиотикам. Однако, данный метод достаточно длителен и трудоемок, наряду с этим имеется ряд возбудителей (анаэробная флора, L-формы микроорганизмов), культивирование которых особенно сложно и не всегда финансово доступно для клинических лабораторий. В микробиологические лаборатории на рутинную обработку поступает много анализов, поэтому необходима разработка быстрых и чувствительных методов идентификации микробов в моче. Перспективным для этого является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который дает возможность быстро и точно идентифицировать бактерии путем анализа генетических особенностей микробов [Kass E. H., 1960; Парфенова Т.В., 2014].

Сравнивая возможности метода ПЦР для обнаружения бактериурий в моче пациентов с ИМП и традиционного культурального метода исследования мочи, можно отметить как преимущества, так и ограничения обоих методов. Наиболее существенным недостатком стандартной бактериологической диагностики является длительность процедуры (иногда более 48 часов). Часто пациентам назначают эмпирическую, не всегда адекватную антибактериальную терапию либо до момента получения результатов исследования мочи, либо вовсе без проведения методов идентификации возбудителя и определения его чувствительности к антибактериальным препаратам. Из-за подобной терапии возрастает риск осложнений в прогрессии заболевания. Есть сведения, что каждый час задержки адекватной антибиотикотерапии пациентов с септическим шоком снижает выживаемость на 8 % [Andreu A. S., 1997; Kumar A. D., 2006].

По сравнению с культуральным методом идентификация микробов методом ПЦР проходит в течение 4 - 5 часов, что позволяет раньше назначить этиотропное лечение. Для правильной постановки необходима точная идентификация и подсчет числа микроорганизмов в клиническом материале. При подозрении на ИМП и бактериурию часто в моче отмечается полиинфекция. Культуральный метод предусматривает применение селективных сред при полимикробной инфекции, но при этом возможны погрешности из-за сложности подбора оптимальных условий культивирования для всех возбудителей заболевания. А проведение дополнительных биохимических исследований для идентификации вида микроорганизмов является достаточно сложной, трудоемкой процедурой и не всегда финансово доступной [Гашимова Д. Т., 1998; Chen H.D., 2005; Парфенова Т.В., 2014].

Достоинствами метода ПЦР, среди различных методов диагностики инфекционных возбудителей являются наиболее высокие показатели чувствительности и специфичности исследования.

Также, к достоинствам метода ПЦР относятся:

- Выявление наличия инфекции на ранних стадиях инфицированности, до проявления клинических симптомов заболевания;
- Возможность использования разнообразного клинического материала;
- Возможность одновременного выявления нескольких микроорганизмов в одной биологической пробе, в отличие от бактериологических методов, где для разных возбудителей используются разные способы культивирования;
- Простые требования к условиям хранения и транспортировки материала от пациента в лабораторию.

Так, ПЦР - метод и классические микробиологические методы идентификации уропатогенов имеют как преимущества, так и недостатки. В отношении некоторых микробов ПЦР - метод неэффективен (не позволяет их определить), а в целом более удобен. В частности, для

идентификации энтеробактерий подходят оба метода. Особую важность применение ПЦР приобретает в случае тяжелобольных пациентов, когда результаты исследования нужны срочно. Поскольку посев мочи является достаточно трудоемким и длительным процессом, ПЦР - диагностика может удачно дополнить клинический и биохимический анализы мочи. Кроме того, быстрое тестирование бактериальных возбудителей позволит избежать назначения неадекватной антибиотикотерапии и тем самым снизить риски развития осложнений, возникновения восходящих инфекций и распространения антибиотикорезистентности микробов.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Выделение бактериальной ДНК

Тотальную бактериальную ДНК выделяли из мочи, используя стандартные наборы для выделения ДНК («ДНК – сорб - АМ», Россия), предварительно отцентрифугировав материал в пробирке при 12 тыс. об/мин в течение 5 мин. Этот метод основан на сорбции ДНК на частичках силикогеля (SiO_2) в присутствии 4 - 6 М гуанидинтиоционата. Лизирующим агентом в данном случае служит Triton X100, 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 SiO_2 + НК уходит в осадок, а надосадочную жидкость, содержащую все остальные компоненты клеток становится возможным удалить.

В ходе работы отбирали необходимое количество одноразовых пробирок, маркировали их. В каждую пробирку вносили по 20 мкл сорбента универсального (силикагель), предварительно ресуспендировав его. После чего во все пробирки добавляли по 300 мкл лизирующего раствора (5М гуанидинтиоционат, 1 % Triton X100). Затем в пробирки с лизирующим раствором вносили по 100 мкл клинического образца. Пробирки плотно закрывали, содержимое тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали 5 мин при 65°C в термостате. После прогревания пробирки снова перемешивали на вортексе и оставляли при комнатной температуре на 2 мин. Затем центрифугировали пробы при 10 тыс. об/мин в течение 30 сек. Не захватывая сорбент, удаляли надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой

пробы. После чего в пробы добавляли по 1 мл отмывочного раствора (5М гуанидинтиоционат), перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Сорбент осаждали центрифугированием при 10 тыс. об/мин на микроцентрифуге в течение 30 сек. Надосадочную жидкость удаляли, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Затем помещали пробирки в термостат с температурой 65°C на 5 - 10 мин для подсушивания сорбента, при этом крышки пробирок были открыты. После чего в каждую пробирку добавляли по 100 мкл TE – буфера для элюции ДНК. Перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Затем помещали в термостат с температурой 65°C на 5 мин. Центрифугировали пробирки при 12 тыс. об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. В итоге получили надосадочную жидкость, содержащую очищенную ДНК, готовую к постановке ПЦР.

2.2. Подбор олигонуклеотидных праймеров

Для подбора праймеров был использован ресурс Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Далее проводили поиск сходных последовательностей по всей базе данных генов с помощью программ ресурса Genbank и программ пакета «Lasergene» («DNASTAR, Inc.», США). В дальнейшем при использовании программы «PrimerSelect» из пакета компьютерных программ «Lasergene» были подобраны пары олигонуклеотидных праймеров, отвечающие следующим требованиям:

- оптимальные праймеры не должны образовывать между собой стабильные димеры и не должны формировать шпилечные структуры;
- желательно, чтобы температура отжига была больше 55°C, но меньше 70°C;
- 3'-конец праймера размером около 10 нуклеотидов должен быть абсолютно комплементарен цепи ДНК;

- разница в температурах отжига между двумя праймерами должна быть минимальной;

- длина праймера от 18 до 30 нуклеотидов.

Для идентификации видового состава энтеробактерий методом ПЦР мы использовали праймеры, подобранные ранее. Так для амплификации *Citrobacter* использовались праймеры CitroF ttgtggtaataaccgcagca и CitroR acagttccscaaggcaccstc. Расчетная температура отжига составила 58⁰С, а размер ампликона 584 п.н.

Также были использованы праймеры для *Hafnia alvei*: HafF aaggccttcgggtgtaaa и HafR agttccscaaggcactaag. Температура отжига 57⁰С, а размер ампликона 625 п.н.

Для *Klebsiella* spp.: KlebF gggaccttcgggcctcatgccatcaga и KlebR tctcacagttccscaaggcassaа. Расчетная температура отжига 60⁰С, размер ампликона 843 п.н.

Для *Proteus* spp.: ProtF ggcggccccctggacaaagac и ProtR tctcacggttccscaaggcactcct. Температура отжига 60⁰С, размер ампликона 315 п.н.

Для *E. coli*: ColEF agctaataaccgcataacgtcgcaagacsaagagg и ColER tctcacggttccscaaggcacttctcatct. Температура отжига 62⁰С, размер ампликона 571 п.н.

Для идентификации *Morganella morganii* были использованы следующие праймеры: MmoF GCCGGGGCTGATTATGGAT и MmoR CGAGATGGGCGCCGGTAGAGTTGT. Размер ампликона должен был составить 346 п.н., а оптимальная температура отжига праймеров 60⁰С.

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 - полимеразы 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 приводит 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 (*multiplex PCR*). 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 (*C. trachomatis* и *N. gonorrhoeae* при заболеваниях урогенитального тракта) [Crotchfelt К. А., 1997] или даже четырех возбудителей (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* и *A. otidis* при хроническом гнойном отите) [Hendolin Р.Н., 1997].

Для избирательной амплификации *in vitro* определенных участков ДНК был использован метод ПЦР. Объем реакционных смесей для 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 3 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°С, после чего следовали 25 - 30 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации ДНК в течение 40 сек при 94°С, стадию отжига праймеров продолжительностью 1 мин 30 сек при температуре от 54 до 72°С (в зависимости от длины и нуклеотидных последовательностей использованных праймеров), и стадию элонгации в течение 1 мин 30 сек при температуре 72°С, 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°С, 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 Gel Camera System (UVP, Inc. США). Для подбора праймеров был использован ресурс Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) и программа PrimerSelect из пакета программ DNASar.

2.4. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле

Добавляли рассчитанное количество порошка агарозы (1 грамм) в отмеренный объем э/ф буфера (2мл 50x TAE буфера и 100мл очищенной воды). Нагревали смесь в микроволновой печи до полного расплавления геля (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 TAE. 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 покрывал агарозу сверху тонким слоем 2 - 3 мм.

Отбирали 7 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 20 - 25 мин. Вынимали пластинку с гелем и помещали ее в кювету для окрашивания. Наливали в кювету слабый раствор бромистого этидия. Окрашивали в течение 10 - 15 мин. Сливали краситель в колбу. Промывали гель проточной водой. Помещали его на стекло трансиллюминатора. Фотографировали гель на фотосистеме Gel Camera System (UVP, Inc. США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Идентификация энтеробактерий молекулярно – генетическими методами

Для подбора праймеров использовали последовательности нуклеотидов 16S РНК генов, опубликованные в GenBank. Номера доступа в GenBank для исследуемых нуклеотидных последовательностей следующие: *Citrobacter* spp. – [GU458292.1](#), *H. alvei* – [EU196322.1](#), *Klebsiella* spp. – [GU458293.1](#), *Proteus* spp. – [FJ711760.1](#), *M. morganii* – [CP004345.1](#) и *E. coli* – [AB548582.1](#). Поиск гомологичных генов осуществляли при помощи программ MegAlignn пакета Lasergene (DNASTAR, США) и программы MegaBlast доступной через сайт <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Для идентификации видового состава энтеробактерий методом ПЦР, были выбраны консервативные участки ДНК, кодирующие 16S РНК. Эти гены являются наиболее удобными как для подбора праймеров, так и для проведения ПЦР. Это связано с тем, что гены 16S РНК представлены в виде нескольких копий и их последовательности для большинства видов энтеробактерий секвенированы и доступны через GenBank. Но, в то же время, последовательности этих генов для различных представителей энтеробактерий отличаются лишь на несколько нуклеотидов, что вызывает дополнительные сложности при подборе оптимальных и отличающихся друг от друга праймеров для ПЦР. В GenBank нами было обнаружено большое количество нуклеотидных последовательностей различных энтеробактерий, среди которых были отобраны только те, которые получены из надежных источников и относятся к клинически важным видам. Была осуществлена попытка подбора праймеров для идентификации таких родов энтеробактерий как *Citrobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella* и *Proteus*. Последовательности генов 16S РНК этих энтеробактерий были вначале выравнены при помощи

программы MegAlign, что позволило определить все переменные участки ДНК, пригодные для подбора праймеров. Эти участки нами были выделены и использованы в дальнейшем для подбора перспективных для типирования праймеров. Подбор праймеров осуществляли при помощи программы PrimerSelect. При подборе праймеров руководствовались такими рассуждениями, что температура отжига должна быть как можно выше, размер ампликона для всех пар праймеров должен отличаться и составлять от 200 п.н. до 1000 п.н. и температуры отжига для различных праймеров должны быть близкими по значению. Дело в том, что чем больше температура отжига, тем специфичнее становятся праймеры и риск ложно - положительных результатов уменьшается. Наиболее простым способом исследования полученных ампликонов является метод агарозного геля - электрофореза, где размер ампликона должен быть больше 200 п.н. При увеличении размера ампликона до 1000 п.н. и больше полимеразы будут тратить слишком много времени для построения цепи ДНК, что так же неприемлемо при создании диагностических систем. Температуры отжига старались делать близкими по значению, что позволяет надеяться на одновременный ПЦР - анализ на различные энтеробактерии. Безусловно, из-за очень высокой консервативности последовательностей ДНК генов 16S РНК и близости между собой различных представителей энтеробактерий для некоторых из них так и не удалось подобрать удачные праймеры. В результате проделанной работы были подобраны праймеры для амплификации *Citrobacter* spp.: CitroF ttgtggtaataaccgcagca и CitroR acagttcccgaaggcaccctc. Здесь расчетная температура отжига составила 58⁰С, а размер ампликона 584 п.н. Также удалось подобрать праймеры для *Hafnia alvei*: HafF aaggccttcgggtgtaaa и HafR agttcccgaaggcactaag. Температура отжига 57⁰С, а размер ампликона 625 п.н. Для *Klebsiella* spp.: KlebF gggaccttcgggcctcatgccatcaga и KlebR tctcacagttcccgaaggcассаа. Расчетная температура отжига 60⁰С, размер ампликона 843 п.н. Для *Morganella morganii*: MmoF gccggggctgattatggat и

MmoR cgagatgggcgccggtagagttgt. Температура отжига 60°C, размер ампликона 346 п.н. Для *Proteus* spp.: ProtF ggcgccccctggacaaagac и ProtR tctcagcgttcccgaaggcactcct. Температура отжига 60°C, размер ампликона 315 п.н. Для *E. coli*: ColEF agctaataccgcataacgtcgcaagacaaagagg и ColER tctcagcgttcccgaaggcacattctcatct. Температура отжига 62°C, размер ампликона 878 п.н. Для остальных энтеробактерий оптимальные и высокоспецифичные праймеры подобрать не удалось. В случае с *E. coli* праймеры были подобраны к уникальному участку ДНК, который не совпадает с ДНК других представителей. Для этого все доступные геномы *E. coli* и нескольких энтеробактерий были выровнены при помощи программы MegaBlast (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Таким образом, в геноме *E. coli* были обнаружены уникальные гены, присущие только данной энтеробактерии. Именно к уникальному участку размером 1300 п.н. (CP004009.1) и были подобраны следующие праймеры: EcoliF АСТССТССТГТТГТАТСТГТСТТТГ и EcoliR АСТГГГСТГТАГГТГГТАТТТАТС. При помощи программы MegaBlast было доказано, что данные праймеры способны гибридизироваться только с ДНК *E. coli*, а на ДНК других энтеробактерий гомологичных участков не обнаружено. Было предсказано, что размер ампликона должен составить 571 п.н., а температура отжига – 53°C.

В качестве клинического материала были использованы образцы мочи больных, страдающими МКБ и ИМП. При исследовании практически во всех клинических образцах была обнаружена ДНК, которая определялась на агарозном геле – электрофорезе (рис. 1).

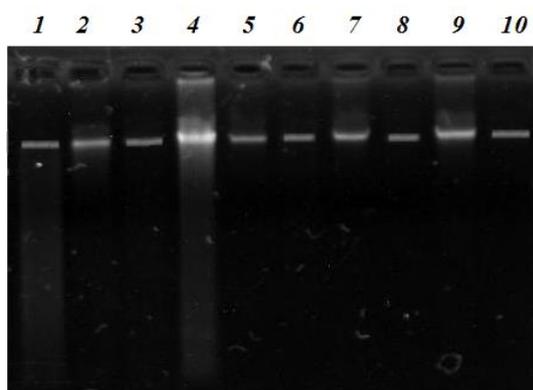


Рис. 1. Агарозный гель - электрофорез totalной ДНК, выделенной из клинического материала.

После подбора и синтеза праймеров было проведено определение видового состава микроорганизмов. Специфичный ампликон *E. coli* нами был выявлен в 32 случаях в образцах под номерами: 2, 4, 5, 10, 12, 18, 23, 27, 31, 33, 35, 36, 41, 42, 47, 49, 52, 55, 58, 59, 61, 64, 67, 68, 71, 72, 76, 79, 85, 89, 90, 93. Электрофореграмма некоторых результатов ПЦР показана на рис. 2., рис. 3. и рис. 4.

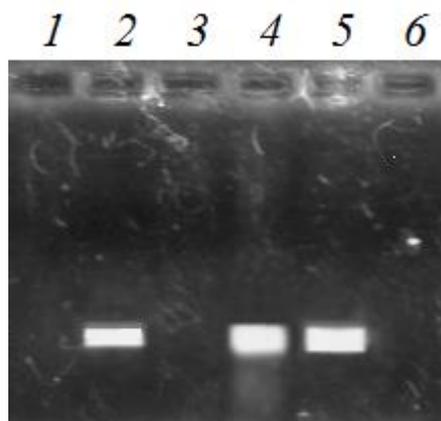


Рис. 2. Электрофореграмма результатов ПЦР уникального участка ДНК *E. coli*. 2, 4, 5 – ампликоны размером 571 п.н.

10 11 12 13 14 15 16

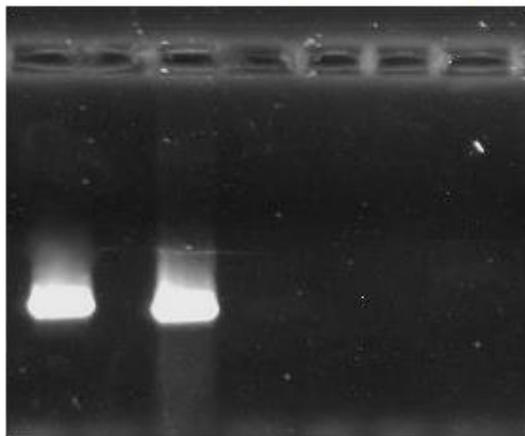


Рис. 3. Электрофореграмма результатов ПЦР уникального участка ДНК *E. coli*. 10, 12 – ампликоны размером 571 п.н.

32 33 34 35 36 37 38

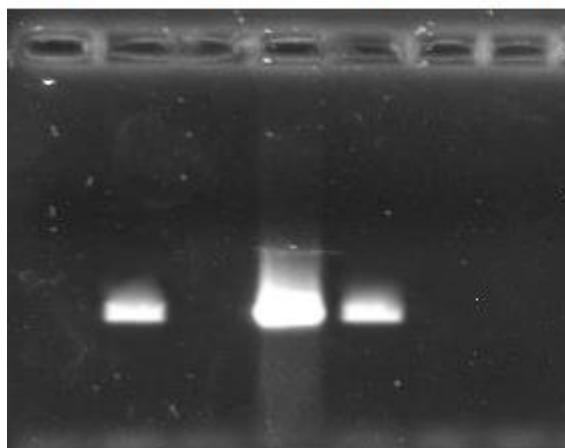


Рис. 4. Электрофореграмма результатов ПЦР уникального участка ДНК *E. coli*. 33, 35, 36 – ампликоны размером 571 п.н.

Далее все образцы ДНК были проверены на присутствие *Citrobacter* spp. и проведена ПЦР при помощи праймеров CitroF и CitroR. *Citrobacter* spp. нами был выявлен в 8 образцах под номерами: 4, 7, 16, 21, 35, 37, 38, 65. Результаты амплификации представлены на рис. 5. и рис. 6.

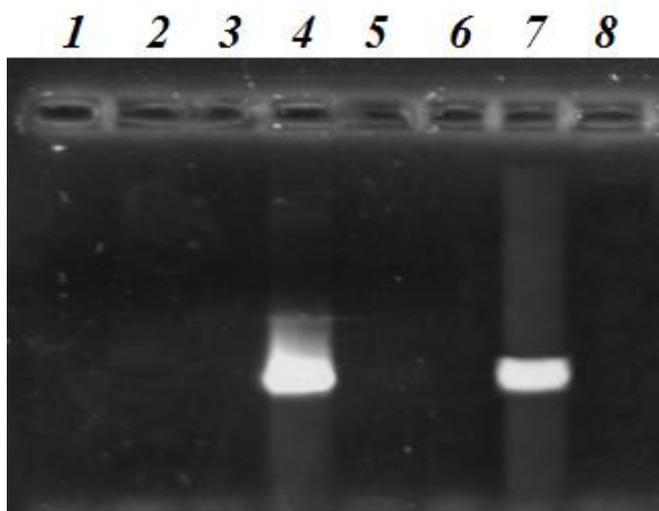


Рис. 5. Электрофореграмма результатов амплификации участка гена 16S РНК *Citrobacter* spp. размером 584 п.н. 4, 7 – специфичные ампликоны *Citrobacter* spp.

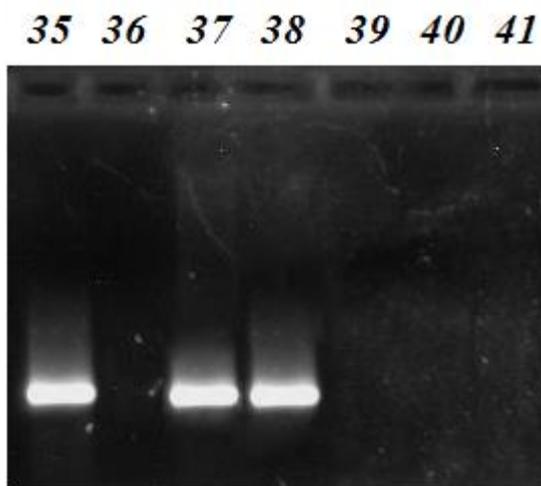


Рис. 6. Электрофореграмма результатов амплификации участка гена 16S РНК *Citrobacter* spp. размером 584 п.н. 35, 37, 38 – специфичные ампликоны *Citrobacter* spp.

Также была осуществлена амплификация участка гена 16S РНК *Proteus* spp. Этот микроорганизм был обнаружен в 16 образцах: 2, 9, 15, 17, 30, 36, 40, 45, 49, 52, 58, 69, 74, 77, 87, 90. Некоторые результаты амплификации представлены на рис. 7. и рис. 8.

10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

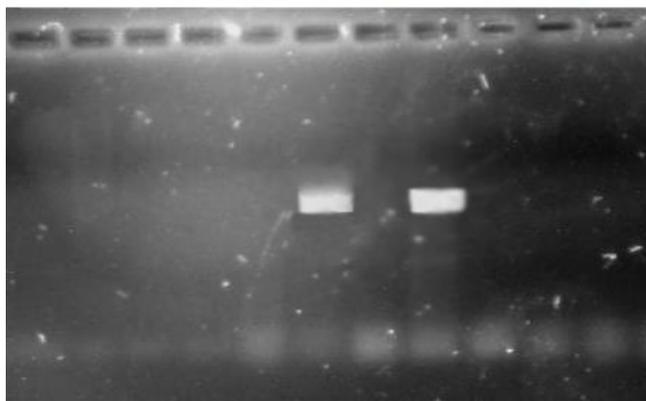


Рис. 7. Электрофореграмма результата ПЦР участка гена 16S РНК *Proteus* spp. размером 315 п.н. 15, 17 – ампликоны *Proteus* spp.

26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38

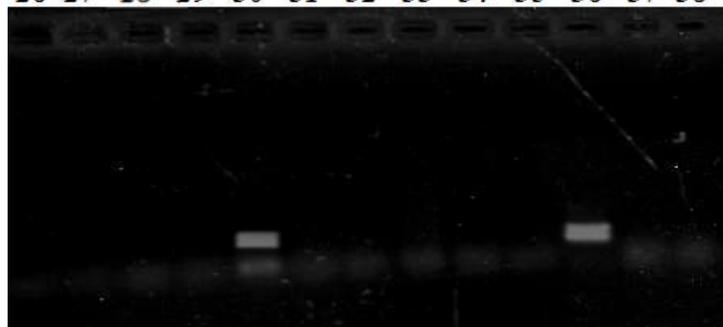


Рис. 8. Электрофореграмма результата ПЦР участка гена 16S РНК *Proteus* spp. размером 315 п.н. 30, 36 – ампликоны *Proteus* spp.

Далее все образцы ДНК были проверены на присутствие *Morganella morganii* и проведена ПЦР при помощи праймеров MmoF и MmoR. *Morganella morganii* нами была выявлена в 8 образцах под номерами: 1, 4, 5, 32, 54, 61, 69 и 88. Результаты амплификации представлены на рис. 9.

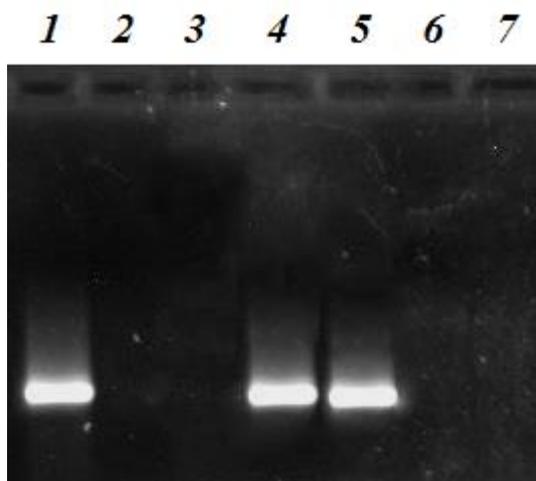


Рис. 9. Электрофореграмма результатов амплификации участка гена 16S РНК *Morganella morganii* размером 346 п.н. 1, 4, 5 – специфичные ампликоны *Morganella morganii*.

ДНК *Klebsiella* spp. нами была обнаружена в 20 образцах под номерами: 1, 3, 4, 6, 11, 12, 14, 17, 18, 20, 27, 35, 39, 44, 47, 62, 67, 73, 78, 85. Электрофореграмма некоторых результатов ПЦР участка гена 16S РНК *Klebsiella* spp. представлена на рис. 10. и рис. 11.

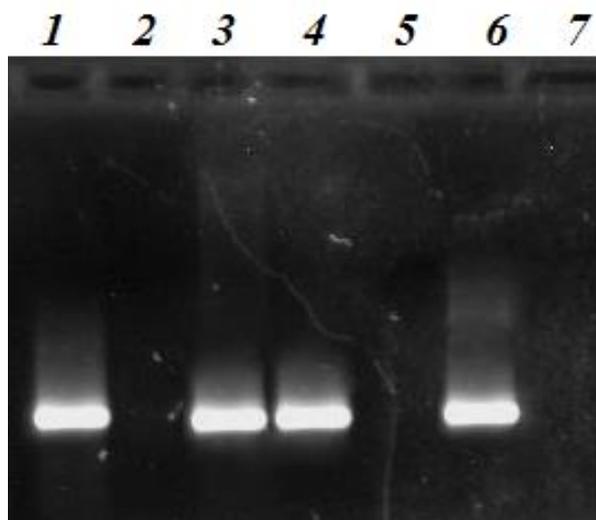


Рис. 10. Электрофореграмма результата ПЦР участка гена 16S РНК *Klebsiella* spp. Размер ампликона 843 п.н. 1, 3, 4, 6 – целевые ампликоны *Klebsiella* spp. размером 843 п.н.

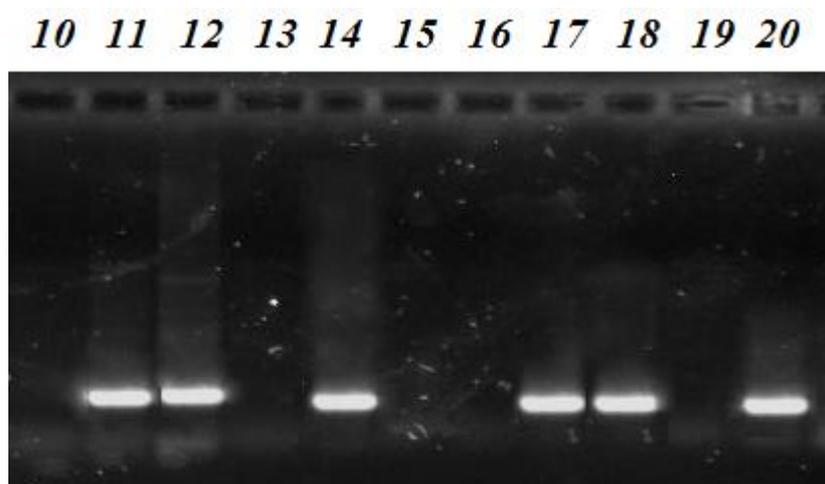


Рис. 11. Электрофореграмма результата ПЦР участка гена 16S РНК *Klebsiella* spp. Размер ампликона 843 п.н. 11, 12, 14, 17, 18, 20 – целевые ампликоны *Klebsiella* spp. размером 843 п.н.

Из всех выделенных нами образцов ДНК, нам не удалось обнаружить *Hafnia alvei*. С каждым из этих пар праймеров мы ставили по 94 ПЦР, однако они ни разу не сработали, что означает, что нам удалось подобрать высокоспецифичные праймеры, но среди выделенных нами ДНК не оказалось этих энтеробактерий.

Наиболее удобными для типирования уропатогенных энтеробактерий являются гены 16S РНК, так как они представлены в нескольких копиях, их последовательности секвенированы для большинства энтеробактерий и доступны через GenBank. Используя эти последовательности, были подобраны оптимальные праймеры для идентификации энтеробактерий. В результате анализа клинических материалов, выделенных от больных МКБ и ИМП, наиболее часто были идентифицированы *Escherichia coli.*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. По данным американских исследователей при МКБ и ИМП наиболее часто выделяются именно эти микроорганизмы, что совпадает с результатами наших исследований. Тем самым их можно отнести к наиболее часто выделяемым энтеробактериям, при МКБ и ИМП. Однако в ходе проведенной работы выяснилось, что к генам 16S РНК очень сложно

подобрать видо- и даже родоспецифичные праймеры. Поэтому в дальнейшей работе было решено использовать в том числе праймеры, подобранные к уникальным для каждого рода или вида участкам ДНК.

3.2. Анализ представленности уропатогенных *Enterobacteriaceae* в исследуемом клиническом материале

Объектом исследования были образцы клинического материала, выделенные от 94 больных, страдающими мочекаменной болезнью и инфекциями мочевыводящих путей. Все клинические образцы были исследованы на присутствие в них ДНК *Enterobacteriaceae*: *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Hafnia alvei*. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Встречаемость энтеробактерий в исследуемых клинических образцах

№ клинического образца	<i>Proteus</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp.	<i>Morganella morganii</i>	<i>Escherichia coli</i> .	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Hafnia alvei</i>
1	-	-	+	-	+	-
2	+	-	-	+	-	-
3	-	-	-	-	+	-
4	-	+	+	+	+	-
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	-	-	+	-
7	-	+	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-
10	-	-	-	+	-	-
11	-	-	-	-	+	-
12	-	-	-	+	+	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	+	-

№ клинического образца	<i>Proteus</i> <i>spp.</i>	<i>Citrobacter</i> <i>spp.</i>	<i>Morganella</i> <i>morganii</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli.</i>	<i>Klebsiella</i> <i>spp.</i>	<i>Hafnia</i> <i>alvei</i>
15	+	-	-	-	-	-
16	-	+	-	-	-	-
17	+	-	-	-	+	-
18	-	-	-	+	+	-
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	+	-
21	-	+	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	+	-	-
24	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	+	+	-
28	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-
30	+	-	-	-	-	-
31	-	-	-	+	-	-
32	-	-	+	-	-	-
33	-	-	-	+	-	-
34	-	-	-	-	-	-
35	-	+	-	+	+	-
36	+	-	-	+	-	-
37	-	+	-	-	-	-
38	-	+	-	-	-	-
39	-	-	-	-	+	-
40	+	-	-	-	-	-
41	-	-	-	+	-	-
42	-	-	-	+	-	-
43	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	+	-
45	+	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	+	+	-
48	-	-	-	-	-	-

№ клинического образца	<i>Proteus</i> <i>spp.</i>	<i>Citrobacter</i> <i>spp.</i>	<i>Morganella</i> <i>morganii</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli.</i>	<i>Klebsiella</i> <i>spp.</i>	<i>Hafnia</i> <i>alvei</i>
49	+	-	-	+	-	-
50	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-
52	+	-	-	+	-	-
53	-	-	-	-	-	-
54	-	-	+	-	-	-
55	-	-	-	+	-	-
56	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-
58	+	-	-	+	-	-
59	-	-	-	+	-	-
60	-	-	-	-	-	-
61	-	-	+	+	-	-
62	-	-	-	-	+	-
63	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	+	-	-
65	-	+	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	+	+	-
68	-	-	-	+	-	-
69	+	-	+	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-
71	-	-	-	+	-	-
72	-	-	-	+	-	-
73	-	-	-	-	+	-
74	+	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	+	-	-
77	+	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	+	-
79	-	-	-	+	-	-
80	-	-	-	-	-	-
81	-	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-	-

№ клинического образца	<i>Proteus spp.</i>	<i>Citrobacter spp.</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Escherichia coli.</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Hafnia alvei</i>
83	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-
85	-	-	-	+	+	-
86	-	-	-	-	-	-
87	+	-	-	-	-	-
88	-	-	+	-	-	-
89	-	-	-	+	-	-
90	+	-	-	+	-	-
91	-	-	-	-	-	-
92	-	-	-	-	-	-
93	-	-	-	+	-	-
94	-	-	-	-	-	-

В ходе проведенных исследований всех клинических образцов положительные результаты по наличию энтеробактерий были получены в 14,9 % случаев (рис. 12).

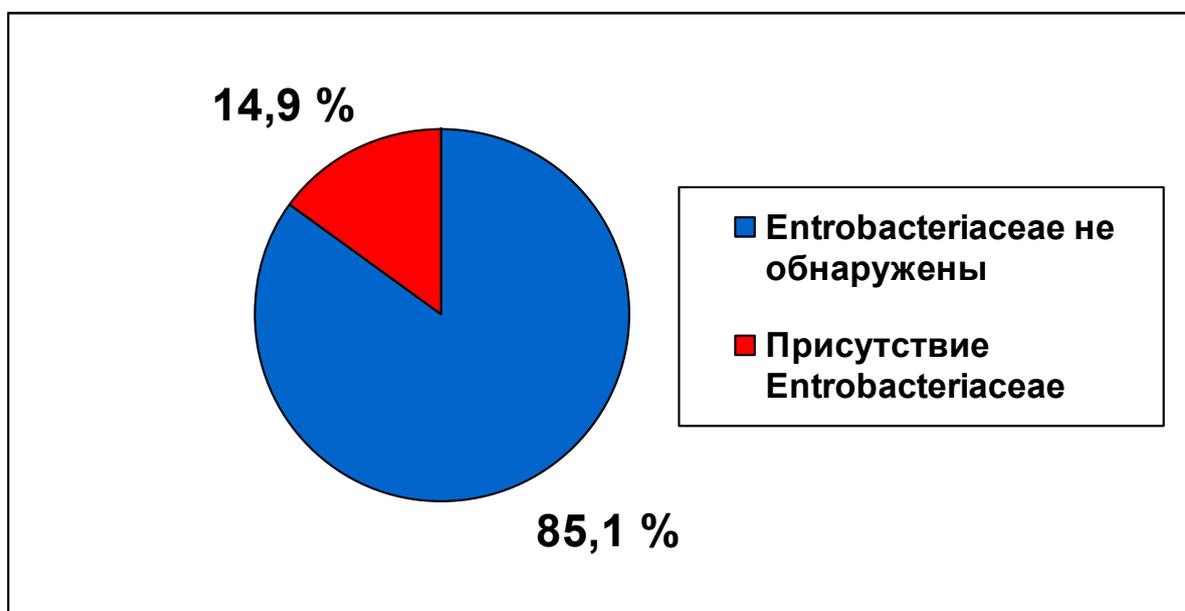


Рис. 12. Сравнение положительных и отрицательных результатов исследований в процентном соотношении.

Частота встречаемости представителей *Enterobacteriaceae* в анализируемом клиническом материале в процентном соотношении представлено на рис. 13.

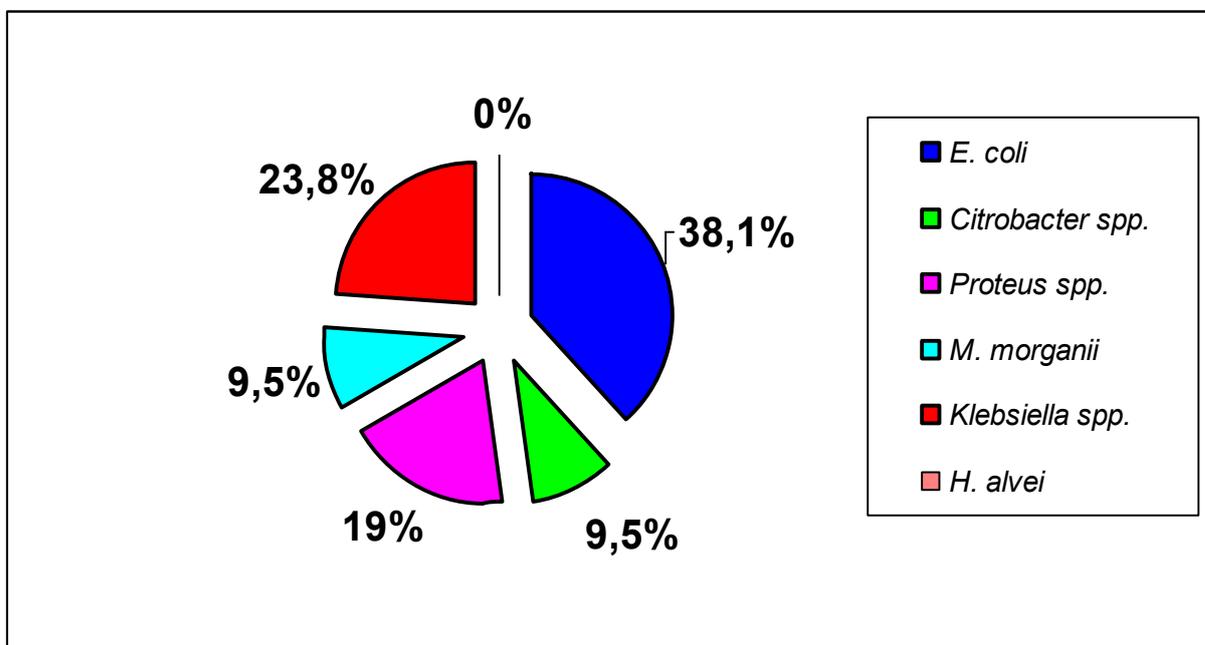


Рис. 13. Частота встречаемости представителей *Enterobacteriaceae* в анализируемом клиническом материале в процентном соотношении.

В результате анализа клинических материалов, выделенных от больных МКБ и ИМП, наиболее часто идентифицировались *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* Среди всех изученных клинических образцов с наибольшей частотой встречалась *E. coli*, что составляет 38,1 % от всех обнаруженных *Enterobacteriaceae*. *Klebsiella spp.* определилась в 23,8 % случаев. *Proteus spp.* составил 19 % от всех обнаруженных *Enterobacteriaceae*. *Citrobacter spp.* и *Morganella morganii* обнаружили в 9,5 % случаев. *Hafnia alvei* не была обнаружена ни в одном клиническом образце.

Используя полученные результаты, мы определили представленность тех или иных *Enterobacteriaceae* в анализируемом клиническом материале в абсолютных значениях. Результаты сравнительного анализа приведены на рис. 14.

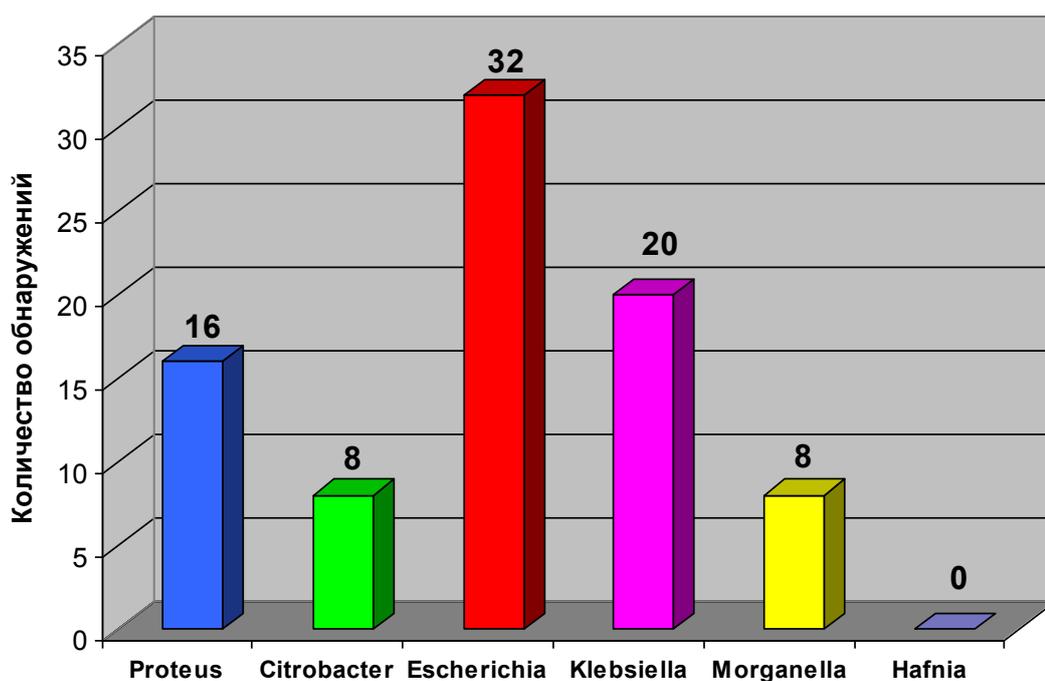


Рис. 14. Частота встречаемости представителей *Enterobacteriaceae* в анализируемом клиническом материале в абсолютных значениях. *Proteus* – *Proteus* spp., *Citrobacter* – *Citrobacter* spp., *Escherichia* - *Escherichia coli.*, *Klebsiella* – *Klebsiella* spp., *Morganella* – *Morganella morganii.*, *Hafnia* - *Hafnia alvei.*

Как видно из рисунка 14, в анализируемом нами клиническом материале, наибольшее число раз были обнаружены такие микроорганизмы, как *Escherichia coli.*, *Klebsiella* spp. и *Proteus* spp. Из всех выделенных нами образцов ДНК, нам ни разу не удалось обнаружить *Hafnia alvei.* Однако следует отметить, что эти данные едва ли могут отражать полную и реальную эпидемиологическую ситуацию в регионе, так как количество клинических образцов было не столь большим и некоторые пары праймеров могут работать более эффективно, а другие хуже.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения данной работы, нами были собраны клинические образцы, выделенные от 94 больных, страдающими мочекаменной болезнью и инфекциями мочевыводящих путей. Далее с помощью молекулярно – генетического метода все клинические образцы были исследованы на присутствие в них ДНК *Enterobacteriaceae: Proteus spp., Citrobacter spp., Morganella morganii, Escherichia coli, Klebsiella spp., Hafnia alvei*. В ходе выполнения данной работы, нами были подобраны олигонуклеотидные праймеры к уникальным участкам ДНК для идентификации ряда микроорганизмов, вызывающих ИМП. В результате анализа клинических материалов наиболее часто обнаруживались *Escherichia coli., Klebsiella spp., Proteus spp.* По данным американских исследователей при МКБ и ИМП наиболее часто выделяются именно эти микроорганизмы, что совпадает с результатами наших исследований [Stamm W.E., 2003]. Тем самым их можно отнести к наиболее часто выделяемым энтеробактериям, при МКБ и ИМП.

Таким образом, обнаружение данных энтеробактерий методом ПЦР позволяет предполагать о том, что они могут быть этиологическими агентами развития воспалительных заболеваний в мочевыводящих путях, которые в свою очередь часто ассоциированы с мочекаменной болезнью.

ВЫВОДЫ

1. Собрана коллекция тотальной ДНК из 94 образцов клинического материала, выделенных от больных мочекаменной болезнью и инфекциями мочевыводящих путей.
2. Наиболее представленными в клиническом материале больных мочекаменной болезнью и инфекциями мочевыводящих путей оказались ДНК *E. coli*, *Klebsiella* spp. и *Proteus* spp. Реже всего в анализируемом клиническом материале обнаруживалась ДНК *Citrobacter* spp. и *Morganella morganii*.
3. Испытанные на клиническом материале пары праймеров могут быть использованы при создании диагностических тест-систем для определения этиологической роли *Enterobacteriaceae* в развитии ИМП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко, В. М. Характеристика плазмиды *Klebsiella pneumoniae*, несущей маркеры лекарственной устойчивости и антилизоцимной активности / В.М. Бондаренко, А.Л.Яблочков, Ю.М. Романова, В.Г. Петровская // Журн. микробиол. - 1988. - №3. - С.28-32.
2. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л. Б. Борисов. - М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005. – 736с.
3. Бондаренко, В.М. Факторы патогенности бактерий и их роль в развитии инфекционного процесса / В.М. Бондаренко // Журн. микробиол. - 1999. - №5. - С.34-39.
4. Бембеева, Е.С. Биологическая характеристика штаммов энтеробактерий, выделенных при пиелонефритах у детей: автореф. дис. канд. мед. наук. Ростов н/Д., 1998. - 22 с.
5. Булгаков, А.К. Антибиотикоустойчивость условно-патогенных энтеробактерий / А.К. Булгаков, З.Г. Габидуллин // Здравоохранение Башкортостана. - 2000. - №3. - С.55-58.
6. Воробьев, А.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / А. А. Воробьев. - М.: МИА, 2004. — 688 с.
7. Гашимова, Д. Т. Характеристика адгезивных свойств бактерий рода *Morganella morganii* / Д.Т. Гашимова, З.Г. Габидуллин, А.Р. Мавзютов, А.К. Булгаков // Актуальные вопросы инфекционной патологии: сб. научн. тр. - Уфа, 1998. - С.100-101.
8. Глыбочко, П. В. Хирургические и урологические болезни. Агрессивные и медикаментозные методы лечения: (избранные лекции) / П. В. Глыбочко и др. Саратов: Изд-во Саратов. мед. ун-та, 2004. - 619 с.
9. Гребельная, Н.В. Проблемы инфекций мочевыводящих путей у женщин / Н.В. Гребельная // Украинский медицинский альманах. – 2004. – Т. 7, № 5. – С. 196-200.

10. Дадабаева, Р.К. Коррекция иммуномодулином нарушений иммунитета у женщин фертильного возраста, больных хроническим пиелонефритом / Р.К. Дадабаева, А.Г. Гадаев, И.А. Ибрагимов // Нефрология. 2000. - Т. 4, № 3. -С. 58-61.
11. Досаева, Л.А. Диагностика, медикаментозное лечение и профилактика мочекаменной болезни / Л.А. Досаева, С.Н. Шатохина, Е.М. Шилов // Клиническая медицина. -2004. -№1.-С. 21-27.
12. Дзеранов, Н.К. Осложнения открытых операций при лечении мочекаменной болезни и пути их профилактики / Н. К. Дзеранов, А. В. Казаченко, Д. А. Бешлиев, С. А. Москаленко, М. Б. Алиев, К. А. Байбарин // Урология. – 2002. - №6. - С. 3-8.
13. Жабченко, И.А. Уропатогенные штаммы *Escherichia coli*: особенности функционирования, факторы вирулентности, значение в клинической практике / И.А. Жабченко // Таврический медицинский биологический вестник. – 2013. – Т. 16, № 2, ч. 2 (62). – С. 201-206.
14. Калугина, Г.В. Хронический пиелонефрит / Г.В. Калугина, М.С. Клушанцев, Л.Ф. Шехаба. М.: Медицина, 1993. - 240 с.
15. Кузнецова, О.П. Инфекции мочевыводящих путей / О.П. Кузнецова, П.А. Воробьев, С.В. Яковлев. М.: НЬЮДИАМЕД, 1996. - 44 с.
16. Коротяев, А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев // – СПб.: СпецЛит, 1998. – 767с.
17. Литвин, В. Ю. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий / В.Ю. Литвин, А.Л. Гинцбург, В.М. Пушкарева и др. - Москва: Фармарус-принт, 1997. - 226с.
18. Лопаткин, Н.А. Урология / Н. А. Лопаткин, А. Г. Пугачев, О. И. Аполихин // ГЭОТАР-Мед, 2004. – 520 с.
19. Лопаткин, Н.А. Лечение инфекционно-воспалительных урологических заболеваний / Н.А. Лопаткин, А.П. Данилков, В.А. Козлов // Урология и нефрология. 1990. - № 4. - С. 4-9.

20. Лопаткин, Н.А. Хронический пиелонефрит / Н.А. Лопаткин // Материалы пленума Правления Всероссийского общества урологов. М., 1996. - С. 107-124.
21. Маянский, А.Н. Микробиология для врачей (очерки патогенетической микробиологии) / А.Н. Маянский. - Нижний Новгород: НГМА, 1999. - 400с.
22. Мельников, В.В. Клиническая лабораторная аналитика. В 4 т. Т. IV. Частные клинические технологии в клинической лаборатории / В.В. Мельников. - М.: Лабинформ-РАМЛД, 1999. — 352 с.
23. Немцов, В. И. Правильное питание при нарушениях обмена веществ / В. И. Немцов. - М., Диля. - 2008. – 160с.
24. Нисевич, Н.И. Современные проблемы инфекционной заболеваемости у детей / Н.И. Нисевич // Педиатрия. - 1995. - №4. - С.67-69.
25. Петровская, В.Г. Общие принципы генетического контроля патогенности бактерий / В.Г. Петровская, В.М. Бондаренко // Журн. микробиол. - 1994. - №3. - С.106-110.
26. Перепанова, Т.С. Комплексное лечение и профилактика госпитальной инфекции мочевых путей: автореф. дис. д-ра мед. наук. М., 1996. - 43 с.
27. Пытель, А. Я. Новые методы выявления пиурии при пиелонефритах / А. Я. Пытель, В. С. Рябинский, В. Е. Родоман // Мед., 1968. - 75с.
28. Пытель, Ю. А. Ошибки и осложнения при рентгенологическом исследовании почек и мочевых путей / Ю. А. Пытель, И. И. Золотарев. - Мед., 1987.- 256с.
29. Прозоркина, Н.В. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии / Н. В. Прозоркина, Л. А. Рубашкина. — Ростов н/Д.: Феникс, 2002. – 416с.

30. Парфенова, Т.В. Возможность ПЦР - диагностики инфекций мочевыводящих путей, вызванных бактериальными возбудителями / Т.В. Парфенова, Н.В. Кириллова, М.Е. Сенина и др. // Лаборатория ЛПУ. – 2014. – № 5. – С. 50-56.
31. Рябов, С.И. Функциональная нефрология / С.И. Рябов, Ю.В. Наточин. - СПб.: Лань, 1997. 304 с.
32. Скрябин, Г. Н. Циститы: учебное пособие / Г.Н. Скрябин, В.П. Александров, Д. Г. Кореньков, Т. Н. Назаров // СПб., 2006. – 127 с.
33. Татаринова, С. Д. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями / С. Д. Татаринова, В. А. Килессо, Н. С. Прямухина и др. - М.: Минздрав СССР, 1984. - 143 с.
34. Тиктинский, О.Л. Мочекаменная болезнь / О. Л. Тиктинский, В. П. Александров. – СПб., «Питер». - 2000. - 384с.
35. Трапезникова, М.Ф. Тактика лечения при "каменной дорожке" / М. Ф. Трапезникова, В. В. Дутов, А. П. Морозов, С. М. Кулачков, И. М. Бейзеров. // Материалы Пленума правления Всероссийского общества урологов. (Саратов, 15-17 сентября 1998). М., - 1998. – 336с.
36. Ширококов, В.П. Микробная экология человека / В.П. Ширококов, Д.С. Янковский, Г.С. Дымент. К.: ООО «Червона Рута-Турс», 2010. – 336 с.
37. 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.
38. Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections / V. Livrelli, C. De Champs, P. Di Martino [at al.] // J. Clin. Microbol. – 1996. - Vol. 34, No. 8. – P. 1963–1969.

39. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis / B. Henderson, S. Poole, M. Wilson // *Microbiol. Rev.* - 1996. - Vol. 60, No. 2. - P.316-341.
40. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens / J.J. Farmer III, B.R. Davis, F.W. Hickman-Brenner [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1985. - Vol. 21, No. 1. - P.46-76.
41. Brandsch M., Ramamoorthy S., Marczin N. et al. Regulation of taurine transport by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and guanylin in human intestinal cell lines.// *J. Clin. Invest.*- 1995, 96.- P.361-369.
42. Chen, H.D. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis / H.D. Chen, G. Frankel // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2005. – Vol. 29, No. 1. – P.83-98.
43. Chan, J.F. A new ASPECT for complicated urinary tract infections / J.F. Chan, K.Y. Yuen // *Lancet.* – 2015. – Vol. 385. – P. 1920 – 1922.
44. Crotchfelt, K. A. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in genitourinary specimens from men and women by a coamplification PCR assay/ K. A. Crotchfelt et al. // *J.Clin. Microbiol.* 1997. - Vol. 35. - P. 1536 -1540.
45. *Citrobacter rodentium*, the causative agent of transmissible murine colonic hyperplasia, exhibits clonality: synonymy of *Citrobacter rodentium* and mouse-pathogenic *Escherichia coli* / S.A. Luperchio, J.V. Newman, C.A. Dangler [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* - 2000. - Vol. 38, No.12. - P.4343-4350.
46. Donnenberg, M.S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* / M.S. Donnenberg, T.S. Whittam // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 107, No. 5. – P.539-548.
47. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection induces expression of the early growth response factor by activating mitogen-activated protein kinase cascades in epithelial cells / M. De Grado, C.M. Rosenberger, A. Gauthier [et al.] // *Infect. Immun.* - 2001. - Vol. 69, No. 10. - P.6217–6224.

48. Finlay, B.B. Common themes in microbial pathogenicity / B.B. Finlay, S. Falkow // *Microbiol. Rev.* –1989. - Vol. 53, N. 2. - P. 210 - 230.
49. Farmer III, J.J. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens / J.J. Farmer III, B.R. Davis, F.W. Hickman-Brenner [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1985. - Vol. 21, N. 1. - P. 46-76.
50. Foxman, B. B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economic costs / B. B. Foxman // *Am. J. Med.* – 2002. – Vol. 113. – P. 5–13.
51. Grabe, M. G. Urinary Tract Infection / M. G. Grabe, T.E. Bjerklund-Johansen, H. Botto et al. // *European Association of Urology.*- 2011. - Vol.114. – P.12-17.
52. Hendolin, P.H. Use of Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Four Bacterial Species in Middle Ear Effusions / P.H. Hendolin, A. Markkanen, J. Ylikoski, J.J. Wahlfors // *J Clin Microbiol.* -1997. Vol. 35, N. 8. – P. 2854.
53. Heterogeneity in phenotypic and genotypic characteristics among strains of *Hafnia alvei* / A. Ismaili, B. Bourke, J.C.S. De Azavedo [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. - Vol. 34, No. 12. - P.2973–2979.
54. Host susceptibility to the attaching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium* / B.A. Vallance, W. Deng, K. Jacobson, B.B. Finlay // *In-fect. Immun.* - 2003. - Vol. 71, No. 6. - P.3443–3453.
55. Kass, E. H. / The role of asymptomatic bacteriuria in the pathogenesis of pyelonephritis / E. H. Kass, E. L. Quinn // *Biology of pyelonephritis.* Boston: Little. – 1960. P. 399 - 412.
56. Kumar, A. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock / A. Kumar, D. Roberts, K. E. Wood et al. // *Crit. Care Med.* – 2006. – Vol. 34. – P. 1589-1596.

57. Kuhn M., Adermann K., Jahne J. et al. Segmental differences in the effects of guanylin and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin on secretion in human gut.// J.Physiol.(London).- 1994, 479.- P.433-440.
58. Meccas J., Strauss E.J. Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence: Type III Secretion and Pathogenicity Islands // Emerging Infectious Diseases. – 1996. – Vol. 2, № 4. – P. 271 –290.
59. Naber, K.G. Urogenital Infections / K.G. Naber, A.J. Scaeffler, C.F. Heyns // European Association of Urology. - Arnhem, The Netherlands, 2014. - Part 19. P. 1–107.
60. Nataro, J.P. Diarrheagenic *Escherichia coli* / J.P. Nataro, J.B. Kaper // Clin. Microbiol. Rev. - 1998. - Vol. 11, No. 1. – P.142-201.
61. Picket C.L., Whitehouse C.A. The cytolethal distending toxin family.// Trends Microbiol.- 1999, 7.- P.292-297.
62. Ritter A, Blum G, Emody L, Kerényi M, Bock A, Neuhierl B, et al.tRNA genes and pathogenicity islands: influence on virulence and metabolic properties of uropathogenic *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. – 1995. – Vol. 17, № 1. – P. 109-121.
63. Schauer, D.B. Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* bio-type that causes transmissible murine colonic hyperplasia / D.B. Schauer, S. Falkow // Infect. Immun. - 1993. - Vol. 61, No. 6. - P.2486–2492.
64. Stamm, W.E. Management of urinary tract infections in adults / W.E. Stamm, T. M. Hooton // Med. – 2003. - Vol. 329. – P. 1328–1334.
65. Smith, P.W. Microbiologic survey of long-term care facilities / P.W. Smith, C. W. Seip, S. C. Schaefer, C. Bell–Dixon // Infection Control. - 2000. - Vol. 28. – P. 8–13.
66. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen / S.C. Clarke, R.D. Haigh, P.P.E. Freestone, P.H. Williams // Clin. Microbiol. Rev. – 2003. - Vol. 16, No. 3. - P.365–378.

67. Volmer M., de Vries J.C., Goldschmidt H.M. Infrared analysis of urinary calculi by a single reflection accessory and a neural network interpretation algorithm. *Clin. Chem.*, 2001, v. 47, N 7. P.1287-1296.

68. Wall I., Tiselius H.G. Long-term acidification of urine in outpatients treated for infected renal stones. *Urol. Int.*, 1990, v. 45, N 6. P.336-341.

69. Yagisawa T., Ito F., Kobayashi C., Onitsuka S., Kondo T., Goto Y., Toma H. Retroperitoneoscopic pyelolithotomy via a posterior approach for large impacted renal pelvic stone. *J. Endourol.* 2001 Jun;15(5):525-528.

70. Yagisawa T., Kobayashi C., Hayashi T., Yoshida A., Toma H. Contributory metabolic factors in the development of nephrolithiasis in patients with medullary sponge kidney. *Am. J. Kidney Dis.*, 2001, v. 37, N 6. P.1140-1143.

71. Yoshida O., Terai A., Ohkawa T., Okada Y. National trend of the incidence of urolithiasis in Japan from 1965 to 1995. *Kidney Int.*, 1999, Nov., v. 56, N 5. P. 1899-1904.

72. Ueno A., Kawamura T., Ogawa A., and Takayasy H.: Relation of spontaneous passage of ureteral calculi to size. *Urology.* -1977 - №10. P. 5

ПРИЛОЖЕНИЕ

Справка об антиплагиате студентки 401 А группы Мусавировой А. А.

Информация о документе:

Имя исходного файла: Диплом_Мусавирова А.А.docx
Имя компании: Башкирский государственный медицинский университет
Тип документа: Прочее
Имя документа: дипломная работа Мусавирова А. А.

Текстовые статистики:

Индекс читаемости: сложный
Неизвестные слова: в пределах нормы
Макс. длина слова: в пределах нормы
Большие слова: выше нормы!
Оригинальные блоки: 73.49%
Заимствованные блоки: 26.51%
Заимствование из "белых" источников: 0%
Итоговая оценка оригинальности: **73.49%**



**Отзыв научного руководителя
о прохождении дипломной практики**

студентки 4 курса обучения
медико – профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

**Мусавировой Альбины Альбертовны по теме:
«МОЛЕКУЛЯРНО – ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА УРОПАТОГЕННЫХ
ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ»**

Студентка Мусавирова А.А. проходила дипломную практику в лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН. За время прохождения практики проявила себя, как грамотная студентка, прилежно относящаяся к поставленным задачам практики, в полном объеме выполнила установленную программу. В процессе прохождения практики Мусавирова А. А. показала хороший уровень теоретических знаний, и закрепила их практическими навыками с большой долей самостоятельности в работе. За время прохождения практики студентка изучила большой объем литературных источников. Она владеет основными молекулярно – микробиологическими методами исследований, хорошо ориентируется по современным биологическим базам данных и имеет хорошую теоретическую подготовку. Мусавирова А.А. зарекомендовала себя с положительной стороны, нарушений правил внутреннего трудового распорядка не допускала. Добросовестно исполняла указания руководителя практики, замечаний к практиканту нет.

Результат дипломной практики Мусавировой А.А. заслуживает положительной оценки.

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



Б. Р. Кулуев

РЕЦЕНЗИЯ

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

ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

Мусавировой Альбины Альбертовны

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Молекулярно – генетическая характеристика патогенного потенциала уропатогенных энтеробактерий».

В дипломной работе рассматривается одна из актуальных проблем на сегодняшний день – инфекции мочевыводящих путей. 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, написан научным стилем изложения. Освещены подходы изучения отечественных и зарубежных ученых по вопросу идентификации энтеробактерий. Проанализированы факторы, особенности течения болезни и пути заражения инфекциями мочевыводящих путей.

В практической части дипломной работы представлена поэтапная программа изучения заданных целей. 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. Работа выполнена в соответствии с требованиями ГОСТа. Она актуальна, полна, качественна. Существенных недостатков работа не имеет.

Дипломная работа Мусавировой А.А. выполнена полностью в соответствии с предъявляемыми требованиями, рекомендована к защите и заслуживает положительной оценки.

с.н. ЦНИЛ к.б.н.



РЕЦЕНЗИЯ

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

Мусавириной Альбины Альбертовны

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Молекулярно – генетическая характеристика патогенного потенциала уропатогенных энтеробактерий».

Рассматриваемая проблематика действительно актуальна и представляет научный интерес, поскольку инфекции мочевыводящих путей, 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 включает введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, представление собственных данных и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, приложения. 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 Мусавириной А. 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 положительную оценку.

М.н.с. лаборатории молекулярной генетики человека

ИБГ УНЦ РАН, к.б.н.



С.Л. Лобов