

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

Медико-профилактический факультет с курсом микробиологии

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

Павлова Анастасия Алексеевна

**МИКРОБИОТА КОРАЛЛОВИДНЫХ
КАМНЕЙ, ОБРАЗУЮЩИХСЯ ПРИ
МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ**

РУКОВОДИТЕЛЬ:

Д.Б.Н.

()

Б.Р.КУЛУЕВ

УФА

СОДЕРЖАНИЕ:

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	4
1.1. Эпидемиология.	7
1.2. Диагностика мочекаменной болезни.....	7
1.3. Классификация и химический состав почечных камней.....	8
1.3.1. Классификация камней в зависимости от их химического состава.....	8
1.3.2. Классификация камней в зависимости от водородного показателя мочи.	10
1.4. Коралловидный нефролитиаз.....	11
1.5. Роль бактерий в образовании коралловидных камней.....	12
1.5. Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	15
1.6.1. <i>Escherichia coli</i>	15
1.6.2. <i>Klebsiella pneumonia</i>	15
1.6.3. <i>Proteus mirabilis</i>	16
1.6.4. <i>Morganella</i>	16
1.7. Семейство <i>Staphylococcaceae</i>	17
1.7.1. Род <i>Staphylococcus</i> spp.....	17
1.8 Семейство <i>Pseudomonadaceae</i>	18
1.8.1 Род <i>Pseudomonas</i>	18
1.9. Патогенность бактерий.....	19
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	22
2.1. Клинико-лабораторное обследование больных.....	22

2.2. Сбор клинических образцов.....	22
2.3 Выделение бактериальной ДНК.....	23
2.3.1 Выделение бактериальной ДНК набором ДНК «сорб-ам».....	23
2.3.2 Выделение бактериальной ДНК методом солевой экстракции.....	24
2.4. Амплификация участков ДНК геномов микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции.....	25
2.5. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле.....	27
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	29
3.1. Идентификация бактерий молекулярно – генетическими методами.....	29
Заключение.....	36
Выводы.....	37
Список литературы.....	38
Приложения.....	42

ВВЕДЕНИЕ

Уролителиаз (мочекаменная болезнь) занимает главное место в урологических болезнях. В литературных источниках есть данные, что 10% населения Европы, 15% –Америки, 8% – Азии и до 30% – в других странах востока страдают мочекаменной болезнью. В индустриально развитых странах выявляется до 2 млн. случаев камнеобразования в мочевыводящих путях на 2 млн населения за год .

Лечение МКБ дорогостоящее. Так как отмечается рост заболеваемости, и разрабатываются высокоэффективные дорогостоящие технологии лечения уролителиаза. Например, в южных странах Европы на лечение мочекаменной болезни тратится около 100 млн евро в год. Такая же сумма тратится на лечение МКБ в Англии. В Германии тоже наблюдается рост заболеваемости МКБ с 0,6% в 1980 году до 1,5% в 2000 году: первичной заболеваемости от 0,1% до 0,7%; рецидивного камнеобразования от 0,4% до 0,8%. На стационарное лечение МКБ в этой стране выделяется 500 млн. евро в год. В Европе лечение пациентов с МКБ обходится примерно в 3 млрд евро в год. Уровень заболеваемости мочекаменной болезнью растет в странах СНГ. Он варьирует в пределах 150-200 случаев на 100 000 населения в Российской Федерации 220-290 случаев на 100 000.

Известно, что при МКБ делают определение видового состава микробиоты мочевыводящей системы. Не известно влияет ли микрофлора на образование камней или же наоборот.

Представители семейства *Enterobacteriaceae* часто выявляется при мочекаменной болезни. Эти бактерии в основном условно-патогенные. Есть сведения, что эти микроорганизмы могут принимать участие в патогенезе инфекций мочевыводящих путей, и так влиять на возникновение и течение МКБ. Особый интерес представляет изучение

изменения состава микробиоты представителей семейства *Enterobacteriaceae* коралловидных камней, потому что микроорганизмы могут негативно влиять на развитие заболевания.

Вместе с тем мнения по данному вопросу очень противоречивы, так как выявляемость микроорганизмов при данной патологии традиционными методами (микроскопия, культуральный) невозможна. Необходимые данные можно получить при использовании молекулярно-генетических методов, например, ПЦР. Эти методы обладают высокой чувствительностью и специфичностью.

Целью работы является молекулярно-генетическая характеристика видового состава микробиоты коралловидных камней при мочекаменной болезни и оценка роли в этом процессе представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

Задачи исследования:

1. Установить наиболее информативные ДНК-мишени, позволяющие определить видовой состав энтеробактерий.
2. Подобрать видоспецифичные праймеры для ПЦР-идентификации бактерий.
3. Собрать коллекцию клинических образцов коралловидных камней.
4. Выделить тотальную ДНК из клинического материала.
5. Провести ПЦР-анализ, выделенной ДНК, при помощи подобранных праймеров.
6. Определить видовой состав бактерий.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Эпидемиология

Уролителиазом болеют во всех странах. Чаще всего в России встречается на юге. В других странах он встречается в восточных странах Евразии и в Америке. Мочекаменная болезнь составляет до 38 % всех болезней выделительной системы по мировой статистике.

В следствии мочекаменной болезни у каждого четвёртого возникает инвалидность. Так же отмечается, что уролителиаз появляется в трудоспособном возрасте. В этих особенностях состоит медико-социальное значение мочекаменной болезни. Камни могут формироваться в почечных чашках, в лоханках, мочеточниках, мочевом пузыре и мочеиспускательном канале. Обычно камни образуются только в одной почки, но возможно образование камней сразу в двух почках. Почечные камни могут быть одиночными и множественными. По форме они различны. Длина - от 2 мм до гигантских - более 11 см, масса - до 900 г [Комяков Б.К., 2011].

1.2. Диагностика мочекаменной болезни

Болезненные ощущения при мочекаменной болезни могут быть постоянные или интермиттирующие, тупые или острые. Локализация болезненности зависит от нахождения камня. Коралловидные камни почки неподвижны и могут вызывать тупые боли в поясничном отделе. Без болевых ощущений мочекаменной болезни почти не протекает. При нефролителиазе существует связь между болью от движений. Когда камень продвигается вниз по мочеточнику последовательно меняется место боли. Она появляется ниже в паховой области [Аль-Шукри С.Х., Ткачук В.Н., 2012].

1.3 Классификация и химический состав почечных камней

Сначала нарушаются коллоидно-кристаллоидные отношения в моче, а потом уже образуется сам камень. Так происходит кристаллизация веществ, которые трудно растворяются. Термодинамическое равновесие, которое поддерживается, ингибиторами кристаллизации. Ингибиторы кристаллизации имеют в составе низкомолекулярные белковые соединения, нуклеоальбумины и муцины. Гликопротеиды и белки сыворотки крови попав в мочу могут нарушить равновесие. Так же они образуют центры образования камней. Эти центры состоят из нерастворимых солей, белков. Камнеобразование – это сложный и многоуровневый процесс, где главную роль могут играть различные факторы [Комяков Б.К., 2012].

Обычно выделяют 2 группы мочевых камней. В одной группе главным является катион - неорганический кальций. Например, оксалаты и фосфаты. Эти камни однородны. В другой группе - анион. К этой группе относят низкополимерные вещества: мочевая кислота и ее соли, цистин, ксантин.

Химический состав мочевых камней может зависеть от пола больных. Оксалаты обнаруживают чаще у мужчин, фосфаты — у женщин. В процентном соотношении: у мужчин составили 40 %, у женщин - 7 % . Коралловидные камни почек на 91 % состоят из фосфатов кальция и магния, в 7 % — из мочевой кислоты и ее солей. В коралловидных камнях у женщин наблюдается магниевых солей фосфорной кислоты, у мужчин – кальциевых солей [Тиктинский О.Л., 2005].

1.3.1 Классификация камней в зависимости от их химического состава

Кальцийоксалатные камни образуются вследствие повышения концентрации оксалатов. Если свободного кальция в кишечнике мало, всасывание происходит с помощью диффузии. При незначительном увеличении данного процесса и повышение уровня оксалатов в моче образуют ядра кристаллизации, которые могут и дальше расти. Затем анион щавелевой кислоты присоединяется с катионом кальция и образуется труднорастворимая соль - оксалат кальция в виде моногидрата. Оксалаты темноватые поверхность неровная.

Фосфатные камни образуются вследствие инфекций. Они в составе имеют смеси аммония и магния фосфата. Образуются эти камни при участии бактерий, которые могут расщеплять мочевины до образования аммиака и двуокиси углерода. К этим бактериям относят кишечную палочку, синегнойную палочку, клебсиеллу и тд. Это приводит к освобождению бикарбоната и аммония. Таким образом, может повышаться рН мочи, что приводит к образованию камней. Чаще всего обнаруживают фосфатные камни, причём у женщин они обнаруживаются чаще. Фосфатные камни серого или беловатого цвета, по структуре они рыхлые.

Уратные камни составляют 8 % от всех мочевых камней. Они могут образовываться при подагре, при онкологиях. Камни образуются при нарушении синтеза пуринов. Низкий уровень рН способствует образованию уратных камней. В составе уратных камней есть кристаллы мочевой кислоты и (или) ее солей. Цвет камней желто-коричневого, чаще всего с гладкой поверхностью. По структуре они плотные.

Цистиновые и ксантиновые камни встречаются не часто. Возникают они при нарушении канальцевой реабсорбции цистина, орнитина, лизина, аргинина. Их концентрация повышается. Цистин плохо растворяется в моче, поэтому образуется осадок с образованием цистиновых камней. Ксантиновые камни образуются при наличии дефектной ксантиноксидазы. Ксантин это труднорастворимая соль, так появляются ксантиновые камни [Комяков, 2014].

Коралловидные же камни почек, по данным литературы, на 91% в составе имеют фосфатов кальция и магния, в 7 % — из мочевой кислоты и ее солей [Кок, D. J., 2004].

1.3.2 Классификация камней в зависимости от водородного показателя мочи

Камнеобразованию способствует 32 патогенетических факторов, выделяют: высокой концентрации солей, разные значения pH мочи наличие инфекции [Истратов, В. Г. Патогенетические факторы развития мочекаменной болезни, Материалы XIII конгресса Российского общества урологов. - М.; 2013. - С. 292].

I. Неорганические камни:

- При pH мочи 6,0: кальций оксалат (вевеллит, ведделлит);
- При pH мочи 6,5: кальций фосфат (гидроксилапатит, брушит, витлокит);
- При pH мочи 7,1: магний аммоний фосфат (струвит).

II. Органические камни:

- При pH мочи 5,5-6,0: мочевая кислота, ее соли (ураты), цистин, ксантин;

- При рН мочи 6,0: урат аммония.

(Тиктинский О.Л. учебное пособие «Мочекаменная болезнь», 2010 , 360с)

1.4 Коралловидный нефролитиаз

Плохо изучены сложные формы мочекаменной болезни. Например, коралловидный нефролитиаз –отличается от других форм мочекаменной болезни симптомами и механизмами камнеобразования, разные методы диагностики [M. Ordon, et al., 2012].

Коралловидный нефролитиаз частая форма мочекаменной болезни и составляет до 45%. Коралловидные камни реже обнаруживаются у женщин. При коралловидном нефролитиазе почти нет симптомов. При коралловидных камнях отсутствует почечная колика. Где есть некроз на слизистых, происходит отложение камней.. Коралловидный нефролитиаз характеризуется отхождением кристаллов мочевых солей, слизи и гноя. Коралловидные камни локализуются в лоханке почек. рН мочи 7-8 следовательно щелочная. При посеве посевом мочи больных выявились микроорганизмы : *Staphylococcus*, *E. coli*, *Proteus* больных.

Камни удаляют при нарушении функционировании почек и оттока мочи. Вид операции выбирают в каждом случае строго индивидуально в зависимости от размера и формы камня, выраженности ретенционных изменений чашечно–лоханочной системы, степени воспалительного процесса, функционального состояния почки [Лопаткин Н.А. и соавт., 2013].

Появление коралловидных камней часто связано с бактериальной инфекцией выделительной системы. Коралловидные камни образуются при участии бактерий. Они способны закладывать начало процесса

образования камней, с помощью мукопротеидов и уростаза [Глыбочко П. В. и соавт. 2011; Перепанова Т.С. и соавт., 2013; Shoshany O. et al., 2012].

1.5 Роль бактерий в образовании коралловидных камней

Камни образуются под воздействием инфекций, на поверхности камней могут образовываться колонии бактерий [Перепанова, Т. С. Роль инфекции мочевых путей в генезе камней, Материалы XIII конгресса Российского общества урологов, 2013].

Образованию камней способствует 2 вида инфекций: рецидивирующая и хроническая. Обычно такие инфекции вызваны уреазо-положительными бактериями. Струвитные камни например образованы *Proteus mirabilis* [TorzewskaA1, RozalskiA 2011].

Образование камней происходит в 3 этапа. Первый этап- повышение концентрации нерастворимых солей. Второй этап – кристаллизация солей. Третий этап – кристаллы остаются в организме [Basavaraj et al., 2007]. Все эти этапы говорят о патогенном воздействии бактерий. Первый и второй этап связаны также с ферментом уреазы. Гидролиз мочевины под воздействием уреазы освобождает NH_4 , рН мочи повышается. Поэтому соли не растворяются и они кристаллизуются, что приводит к образованию камней. Так образуются струвиты [Prywer, Torzewska, 2009]. Полисахариды бактерий позволяют удерживать кристаллы. Бактерии образуют колонии на шероховатых поверхностях камней [Tavichakorntrakool et al., 2012]. Струвитные камни образуются чаще всего уреазо-положительными бактериями, например рода Протей [Крамер и др., 2010]. Важную роль в камнеобразовании играют бактерии, образующие уреазу сем. Enterobacteriaceae. Бактерии продуцирующие уреазу изучаются в качестве источников образования камней. Например: *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, разновидности *Staphylococcus* [Daudon, M. Epidemiology of urolithiasis 2011- Vol. 61, suppl. 3. - P. 372-378].

При исследовании 300 почечных камней было обнаружено 96 инфицированных камней, что составляет 32% от общего количества. Средний возраст больных мочекаменной болезнью составил $56,2 \pm 19,85$ лет. Из них 47,9% пациентов были мужчины. Камни обследовали с помощью ДНК сорб-Б. *Enterobacteriaceae*, кроме *E.coli* были более распространены у мужчин и пожилых пациентов. Кишечная палочка семейства *enterobacteriaceae* была идентифицирована у больных. Кроме того ДНК энтеробактерий секвенировали из нескольких оксалата кальция камней в почках. Кишечная палочка избирательно может аккумулироваться на кристаллах моногидрата оксалата кальция. Кишечная палочка, обычно находясь внутри очага камней оксалата кальция (CaOx) в почках и может играть основные роли в камнеобразовании. В присутствии бактерий площадь кристаллов резко увеличивалась. Таким образом, неповрежденные жизнеспособные бактерии *E.coli*, *K. pneumoniae*, *S. Aureus* и *S.pneumoniae*, стимулировали рост кристаллов. Всего было обнаружено 35 случаев *E.coli* (36,5%), 28 случаев *S. epidermidis* (29,2%), а 15 случаев *Proteus mirabilis* (15,6%), так же были обнаружены: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyti*, *Pseudomonas aeruginosa* [Chen P. et al, 2011; Evan Barr-Beare et al 2015; Medina-Polo J et al, 2012; Yu. M. Romanova et al 2014].

При бактериологическом исследовании мочи установлено, что в 59,5% случаев моча была стерильна, в 22,7% случаев из мочи были выделены микроорганизмы в монокультуре, а в 17,8% случаев ассоциации бактерий.

Отмечено, что в 30,5% случаев микроорганизмы были выделены из мочи, собранной как из почечной лоханки, так и из мочевого пузыря, в 3,9% случаев микроорганизмы выделялись только из лоханочной мочи, а в 6,1% случаев – только из мочевого пузыря. Далее был изучен видовой состав микроорганизмов, выделенных из мочи при мочекаменной болезни. Чаще

выделялись *Pseudomonas* spp. (25,6%), *Escherichia* spp. (12,9%), *Alcaligenes* spp. (9,9%), *Enterobacter* spp. (9,9%) и виды *Klebsiella oxytoca* (11,4%) и *Morganella morganii* (8,5%). Реже выделялись представители родов *Staphylococcus* spp. (6,4%), *Citrobacter* spp. (3,5%), *Edwardsiella* spp. (3,5%) [Пашкова Т.М., 2016].

1.6. Семейство *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae — семейство грамотрицательных палочкообразных бактерий. Среди данного семейства есть патогенные бактерии. В семейство включено 40 родов. Роды семейства *Enterobacteriaceae*, имеющие значение в медицине: *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*. Неизвестно значение других родов (*Arsenophonus*, *Cedecea*, *Ewingella*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pragia*, *Rahnella*, *Tatumella*, *Xenorhabdus*, *Yokenella* и др.) [2-ое издания Руководства Берджи, 2001].

1.6.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli — представитель нормофлоры кишечника. Серогруппы 02, 06, 09 соответствуют инфекциям выделительной системы. Инфекция, вызванная кишечной палочкой часто встречается у девушек. Во взрослом организме, кишечная палочка вызывает воспаление выделительной системы. При сочетании кишечной палочки с синегнойной палочкой возникают серьёзные инфекции. Для постановки точного диагноза, проводят бактериологические исследование. Так же определяют биохимические свойства [Белясова, 2012].

1.6.2 *Klebsiella pneumoniae*

Встречается чаще в дыхательной системе. Возможно поражение и выделительной системы. При посеве образуются слизистые колонии. В выделительной системе выделяет эндотоксин, который вызывает лихорадочное состояние. А мембранотоксин поражает клетки [Гордейчик В.И. 2010].

1.6.3 *Proteus mirabilis*

Грамотрицательные бактерии. Внешне напоминает нити, размер- 2 мкм. Протей – небольшой микроорганизм до 3 мкм, имеет вид нитей или нитевидных палочек, который отличаются высокой подвижностью [Воробьева А.А. 2005].

К патогенным свойствам относят: выделение эндотоксина, обладающий токсигенным свойством. Протей имеет О-, Н-, К-антигены. Протей устойчив к внешней среде. Растёт на МПА. *P. mirabilis* может вызывать инфекцию в мочевых путях. Инфекция может перейти в хроническую форму. Цистит обнаруживается в 70% случаев. Протеи активируют уреазу [Вершигора А.Е. 1990].

1.6.4 *Morganella*

Выделяет эндо- и экзотоксины. Эндотоксин может влиять на пищевую систему, но не является специфичным. Энтеротоксин до конца не изучен, возможно он влияет на возникновение камней в почках. (У. Ciznar, 1983; G. Bartcova, V. Majtan, 1984). Эвдотоксин лизирует клетки, вызывая инфекции [(С.Т. Мнацаканов, 1983)].

Фимбрии образуются вокруг бактерии. Они отвечают за наличие адгезии у морганеллы. Адгезия способствует возникновению воспаления. Морганелла колонизируется на слизистых клетках [L. Lautrop, 1974; D.C.

Old, R.A. Adegbola, 1982]. Морганеллы могут выделять во внешнюю среду гемолизины, которые разрушают эритроциты [Л.С.Каврук, 1986, 1994; И.М. Габрилович, В.Б. Базиев, 1989; С.Н. Золотухин, 1994, 1996; L. Emody, 1982 и др].

Декарбоксилазы обеспечивают разрушение АК, например: орнитина, глутаминовой кислоты. Биогенные амины образуются при декарбоксилировании АК. Биогенные амины обладают токсичностью [Ю.В. Галаев, 1968].

1.7 Семейство *Micrococcaceae*

Представители грамположительные. Два рода являются патогенными: *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae* [Микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов /Под ред. В.Н. Царева. - М.: Практическая медицина, 2010 - 581 с]. Бактерии кокковой формы, патогенны. Специфичным признаком являются цитохромы и каталазная активность. Они могут присутствовать или отсутствовать

[Подколзина В. А., Седов А. А. Медицинская микробиология. Конспект лекций. М.: Приор, 2005].

1.7.1.Род *Staphylococcus* spp

Стафилококки выделяют каталазу, обеспечивающую защиту. Защиту от оксидантов обеспечивают каротиноидные пигменты. Стафилококки устойчивы к антибиотикам. Адгезины и тейхоевые кислоты позволяют осуществлять адгезию. Полисахариды могут образовывать биоплёнку [Иммунология инфекционного процесса. Руководство для врачей Под ред. В.И.Покровского, С.П.Гордиенко, В.И.Литвинова. - М., 1994].

Эксфолиативный токсин может образовывать пузыри на коже. От фагоцитоза защищает каталаза. Гиалуронидаза способствует увеличению площади зоны поражения. Фибринолизин образует тромбы и развитие инфекций. ДНКаза расщепляет ДНК. Нейраминидаза помогает проникать в клетки. *S. saprophyticus* выделяет фермент уреазу. Образует капсулу в присутствии мочевины. Возбудитель инфекций выделительной системы. Могут образовывать мочевые камни [Акатов А. К., Зуева. В.С. Стафилококки- М.: Медицина, 2006].

1.8. Семейство *Pseudomonadaceae*

Имеют жгитики, которые располагаются полярно. По форме представители этого семейства бывают: как палочки, так и слабо изогнутые палочки. Все бактерии этого семейства хемосинтезирующие гетеротрофные (*Hydrogenomonas*, *Nitrosomonas*, *Thiobacillus*). Могут использовать органические вещества для жизнедеятельности. Например, ароматические вещества. Бактерии являются слабо патогенными [Микробиология./ Под ред. А.А.Воробьева. - М.: Медицина, 2005 и др. годы издания].

1.8.1 Род *Pseudomonas* spp

Pseudomonas aeruginosa — по Граму не окрашивается и не образует спор. По форме похожа на изогнутую палочку. Длина до 1 мкм.

Могут вырабатывать как эндотоксины, так и экзотоксины. К экзотоксинам относят: экзотоксин А, экзоэнзим S, цитотоксины, гемолизины. экзотоксин А нарушает синтез белков. Экзоэнзим S влияет на развитие воспалительного процесса в лёгких. Цитотоксин обеспечивает цитолиз клеток. Гемолизины разрушают эритроциты. Эндотоксины играют не последнюю роль в воспалительном процессе. Нейраминидаза влияет на синтез нейраминовой кислоты. Протеазы недостаточно изучены.

Коллагеназа разрушает коллаген. Имеет О антиген (соматический), Н антиген (жгутиковый) [Микробиология и иммунология./ Под ред. А.А.Воробьева. - М.: Медицина, 2010 и др. годы издания].

Синегнойную палочку часто обнаруживают при инфекционно-воспалительном процессе в выделительной системе. Чаще всего ее обнаруживают у пациенты при МКБ. Воспалительный процесс может начаться в пересаженной почке. Инфекция возникает при пониженном иммунитете. Через мочевые пути инфекция может перейти в кровь и так распространиться по всему организму. В выделительной системе синегнойная палочка локализуется в мочевыводящем канале, почках, мочевом пузыре. Могут появляться язвы на слизистой лоханок почек, что говорит о синегнойной инфекции и возможно ведёт к образованию камней[Актуальные проблемы клинической микробиологии (сборник научных трудов) НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи. - М., 2010].

1.9. Патогенность бактерий

Среди бактерий по способности вызывать заболевание выделяют:

- 1) патогенные;
- 2) условно-патогенные;
- 3) сапрофитные.

Патогенность— возможность бактерий вызывать различные заболевания. В этом бактериям помогают их особые свойства: выделять токсины, способность к адгезии, устойчивость к антибиотикам. По патогенности можно определить какой вид бактерий вызвал данное заболевание. Локализация микроорганизма тоже может помочь с определением вида. Полидетерминантность способность образовывать специфические структуры и определённые ферменты, образование которых заложено на генетическом уровне. Вирулентность — это

возможность бактерий проникать в организм животных, размножаться в нём и вызывать воспалительные процессы. Через вирулентность реализуется патогенность. Это штаммовый признак, он поддается количественной характеристике. Вирулентность характерна живым метаболизирующим бактериям и измеряется условно принятыми единицами. Вирулентность бактерий может изменяться. Изменения могут быть вызваны мутациями.

Характеристика патогенных микроорганизмов:

1. Специфичность. Определённый вид бактерий может специфически проявляться. Изменение морфологии, клинические симптомы.

2. Органотропность – локализация бактерий в определённых тканях и органах.

К факторам вирулентности относят:

1) Адгезия – это способ бактерий узнавать рецепторные белки, расположенных на мембранах клеток, закрепляться на них. К инструментам адгезии относят структуры (реснички), специфические белки, особенности строения клеточных стенок бактерий.

2) Колонизация – размножение бактерий и образование колоний;

3) Пенетрация – проникновение бактерий в клетки организма;

4) Инвазия – распространение в тканях. Этому способствуют такие ферменты, как гиалуронидаза и нейраминидаза;

5) Агрессию – противостояние к неблагоприятным факторам иммунитета способность противостоять факторам неспецифической и иммунной защиты организма.

Факторы агрессии:

1) поверхностные структуры клетки. Например мембранные белки, капсулы. Белки подавляют фагоцитоз, капсулы маскируют бактерии

2) ферменты «защиты и агрессии» бактерий – протеазы, гиалуронидаза, коагулаза, фибринолизин, лецитиназа; ферменты способствуют распространению бактерий по тканям хозяина. Уклонение от фагоцитоза происходит за счёт образования капсул. Капсулы бактерий схожи между собой. Они защищают бактерии от внешних воздействий. Иммуноглобулиновое покрытие обеспечивает бактериям защиту от иммунной системы [Бухарин О.В., Литвин В.Ю., 1997].

3) Токсические вещества.

Имеют свойство термолабильности. Экзотоксин – вещество, продуцируемое во внешнюю среду. Вызывают сильный иммунный ответ. Эндотоксины– сложные структуры. Вызывают слабый иммунный ответ.

Адгезия и колонизация. Адгезия – это возможность бактерий размножаться на различных поверхностях, образуя колонии. Адгезины обеспечивают прикрепление к клеткам у грамотрицательных бактерий. Они различны по структуре. Агрессия –выделение токсинов бактериями на иммунный ответ хозяина Инфекция развивается вследствие взаимодействий бактерий со структурами организма [Езепчук Ю.В., 1985].

Трипсиноподобные ферменты расщепляют иммуноглобулины класса А (IgA). Протеазы способствуют расщеплению фибробластов [Бухарин О.В., Усвятцов Б.Я., 1996].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клинико-лабораторное обследование больных

В соответствии с целью исследования клинико-лабораторный отбор больных проводился из числа госпитализированных в Республиканскую клиническую больницу им. Г.Г. Куватова, отделение урологии в 2015 году. Клинические образцы были собраны у 138 больных разными формами мочекаменной болезни в возрасте от 18 до 72 лет. У больных отмечались следующие симптомы: боль в поясничной области, почечная колика и др. Боль в поясничной области постоянная или периодическая, тупая либо острая. Интенсивность и локализация боли зависят от местонахождения и размера камня, а также индивидуальных структурных особенностей мочевых путей. Отмечается на ранней стадии МКБ. Почечная колика - приступообразная боль вызванная камнем, возникает внезапно после езды, тряски, обильного приема жидкости, алкоголя. Боли продолжаются иногда несколько часов и даже дней, периодически стихая. Причиной почечной колики является внезапное нарушение оттока мочи из чашечек или лоханки, вызванное окклюзией верхних мочевых путей камнем. Достаточно часто приступ почечной колики может сопровождаться ознобом, повышением температуры тела, лейкоцитозом. Отмечается на поздней стадии

2.2. Сбор клинических образцов

Для сбора коллекции исследовали клинический материал, полученный от больных: коралловидные камни и мочу. Коралловидные камни растирали в ступке пестиком с добавлением жидкого азота, образцы хранились при -20°C. Моча хранилась при -20°C.

2.3 Выделение бактериальной ДНК

2.3.1 Выделение бактериальной ДНК набором ДНК «сорб-АМ»

Тотальную бактериальную ДНК выделяли из замороженных коралловидных камней, используя стандартные наборы для выделения ДНК («сорб-АМ», Россия). Этот метод основан на сорбции ДНК на частичках силикогеля (SiO_2) в присутствии 4-6 М гуанидинтиоционата. Лизирующим агентом в данном случае служит 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. Для избавления от остатка гуанидинтиоционата осадок промывали 70% этиловым спиртом в присутствии которого комплекс SiO_2 + НК не разрушается и при центрифугировании также уходит в осадок. Надосадочная жидкость также удаляется. При добавлении к комплексу воды, НК переходят в растворимую форму, тем самым освобождаясь от частичек силикогеля. Для лучшего перехода НК в раствор суспензию комплекса в воде прогревали до 65°C.

В ходе работы отбирали необходимое количество одноразовых пробирок. В них добавляли по 300 мкл лизирующего раствора (5М гуанидинтиоционат, 1% Triton X100). Далее маркировали пробирки. В пробирки с лизирующим раствором вносили коралловидные камни. Пробы тщательно перемешивали на вортексе и прогревали 5 мин при температуре 65°C. Центрифугировали 5 сек при 5 тыс. об/мин на микроцентрифуге. Когда проба растворялась не полностью, пробирку центрифугировали на

микроцентрифуге 5 мин при 12 тыс. об/мин и использовали для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенесли ее в новую пробирку. В каждую пробирку отдельным наконечником добавляли по 25 мкл ресуспендированного сорбента (силикагель) и перемешивали на вортексе. Затем пробирки ставили в штатив на 2 мин, еще раз перемешивали и оставляли в штативе на 5 мин. Далее осаждали сорбент в пробирках центрифугированием при 5 тыс. об/мин в течение 30 с. Потом удаляли надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. В пробы добавляли по 300 мкл раствора для отмывки (5М гуанидинтиоционат), перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Сорбент осаждали центрифугированием при 5 тыс. об/мин на микроцентрифуге в течение 30 сек. Надосадочную жидкость удаляли, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы, и добавляли в неё по 950 мкл раствора для отмывки (70% этиловый спирт). Перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировали 30 сек при 10 тыс. об/мин на микроцентрифуге. Надосадочную жидкость удаляли также, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Пробирки помещали в термостат при температуре 65°C на 5-10 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок были открыты. В пробирки добавляли по 50 мкл TE-буфера для элюции ДНК и перемешивали на вортексе. В термостат помещали при температуре 65°C на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе. 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.

2.3.2. Выделение бактериальной ДНК методом солевой экстракции

Основной принцип солевой экстракции – осаждение белков и липидов на кристаллах SDS – Na (додецилсульфата натрия), выпадающих в условиях высокой ионной силы. протеиназа К применяется для удаления белковой примеси в препаратах нуклеиновых кислот. В качестве лизирующего раствора использовали NaCl.

Готовили необходимое количество пробирок. К размельчённым коралловидным камням добавили 40 мкл 20% SDS и 8 мкл протеиназы К с концентрацией 20 мг/мл и тщательно перемешивали. После этого образцы инкубировали при 55-65 градусах течение часа. После этого в образцы добавляли 300 мкл 6M NaCl, тщательно перемешивали на вортексе в течение 30 секунд и центрифугировали 30 минут при 12 тыс. об. мин. Затем надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и добавляли эквивалентное количество изопропанола, перемешали и инкубировали при минус 20 градусов в течение часа. Затем образцы центрифугировали 20 минут при 4 градусах при 12 тыс.об.мин. Осадок промывали 70% этанолом, высушивали и растворили в 300-500 мкл стерильной дистиллированной воды.

2.4. Амплификация участков ДНК геномов микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции

В основе метода ПЦР (полимеразной цепной реакции) лежит способность хорошо известных в молекулярной биологии ферментов, ДНК-полимераз, осуществлять направленный синтез второй, т.е. комплементарной цепи ДНК, по имеющейся матрице одноцепочечной ДНК, наращивая небольшую олигонуклеотидную затравку (праймер), комплементарную участку этой матрицы, до размеров в несколько тысяч

или даже десятков тысяч звеньев. Каждый цикл ПЦР состоит из трех этапов. На первом этапе необходимо денатурировать ДНК, находящуюся в образце. Для этого реакционную смесь нагревают до 92-95°C, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул. На втором этапе происходит отжиг (присоединение праймеров к ДНК-мишени с образованием коротких двухцепочечных участков ДНК, необходимых для инициации синтеза ДНК). С образовавшимися комплексами праймер-матрица связывается ДНК-полимераза и на третьем этапе происходит одновременное копирование ДНК с двух праймеров комплементарных участкам ДНК на противоположных цепях и расположенных таким образом, что полимеризация ДНК с одного праймера приводила к синтезу цепи ДНК, в которой на определенном удалении содержался участок ДНК, комплементарный другому праймеру. Двунитевые фрагменты ДНК, равные по длине расстоянию между двумя праймерами, начинают накапливаться после третьего цикла. Принципиально, что синтезированные в ходе первого цикла ПЦР цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента нуклеиновой кислоты генома вируса, бактерий или человека. В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза все новых и новых цепей.

Для избирательной амплификации *in vitro* определенных участков ДНК был использован метод ПЦР. 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°C, после чего следовали 25-30 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации ДНК в течение 40 сек при 94°C, стадию отжига праймеров продолжительностью 1 мин 30 сек при температуре от 50 до 72°C (в зависимости от длины и нуклеотидных последовательностей использованных праймеров), и стадию элонгации в течение 1 мин 30 сек при температуре 72°C, оптимальной для Taq-полимеразы. В некоторых случаях для оптимизации ПЦР и уменьшения количества неспецифичных продуктов амплификации использовался «горячий старт». По этой процедуре попадание Taq-полимеразы, разбавленной в 10мкл соответствующего 1-кратного буфера, в реакционную смесь осуществлялось только после нагрева последней до 94°C, что исключало возможность неспецифичного отжига праймеров на нуклеотидных последовательностях с низкой гомологией. Качество и количество амплифицированных фрагментов ДНК определяли аналитическим электрофорезом в 1% агарозном геле. После окончания электрофореза гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали на фотодокументационной системе Gel Camera System (UVP, Inc. США). Для подбора праймеров был использован ресурс Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) и программа PrimerSelect из пакета программ DNASTar.

2.5. 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 гели (1,5-2 мин). Раствор остужали до 50°C. В заливочную камеру помещали чисто вымытую стеклянную пластинку. Края камеры обрабатывали остывающей агарозой во избежание дальнейшего вытекания агарозы из камеры. На одном из краев камеры установили пластиковый

гребешок так, что его зубцы образовали в геле лунки для проб ДНК. Необходимо, чтобы между концом зубчиков и стеклянной пластинкой оставался зазор 0,3-0,5 см. Аккуратно заливали в форму теплый раствор агарозы толщиной не более 5-6-мм. Приготавливали 1 л 1-кратного буфера ТАЕ. После полного затвердения агарозы (15-20 мин) аккуратно вынимали гребенку, стараясь не повредить образовавшиеся кармашки. Пластинку с гелем из камеры помещали в электрофоретическую камеру. Заливали в камеру буфер так, что он покрыл агарозу сверху тонким слоем 2-3 мм.

Отбирали 15 мкл раствора ДНК из эппендорфа на пластинку для нанесения проб. Добавляли 3 мкл красителя бромфенолового синего с ксиленцианолом и глицерином. Перемешивали пипеткой. Медленно наносили автоматической пипеткой пробу ДНК с красителем в лунку геля под слой буфера. Подключали клеммы прибора к источнику питания так, чтобы (-) находился на старте, а (+) – на финише. Включали источник питания и устанавливали напряжение в 100 вольт. Проводили разделение ДНК в течение 30-40 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. Выбор метода дробления коралловидных камней

3.1.1. Дробление камней гомогенизатором Minilys

Подготовили нужное количество пробирок, пронумеровали их как и образцы. В гомогенизаторе помещается 2 пробирки. Гомогенизатор имеет 3 режима скорости: низкий, средний, высокий. Для дробления камней использовали средний режим скорости, так как этот режим позволяет достаточно измельчить камни и не повредить ДНК.

3.1.2. Дробление камней в ступке пестиком

Подготовили нужное число пестиков и ступок. Обернули их фольгой и поместили в жаровой шкаф для дезинфекции. Затем в каждую ступку положили по одному камню, добавили жидкий азот и измельчали камни. Таким образом камни легко дробятся и ДНК не повреждается.

3.2. Выбор набора для выделения ДНК

Выделение ДНК производили методом нуклеосорбции. В основе метода сорбция ДНК на частицах силикогеля. Но данный метод оказался не применим в отношении коралловидных камней, так как ДНК не выделялась вообще или выделялась плохого качества. Другим методом стала солевая экстракция. Основан этот метод на осаждение белков и липидов на кристаллах додецилсульфата натрия, выпадающих в условиях высокой ионной силы. Данный метод позволил выделить ДНК высокого качества.

3.3. Идентификация бактерий 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, *Hafnia* spp. – EU196322.1, *Klebsiella* spp. – GU458293.1, *Proteus* spp. – FJ711760.1 и *Escherichia 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>.

Была осуществлена попытка подбора праймеров для идентификации таких родов энтеробактерий как *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella* и *Proteus*, *S. Aureus*, *P. aeruginosa*. Последовательности генов этих бактерий были вначале выравнены при помощи программы MegAlignn, 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 соображениями, что температура отжига должна быть как можно выше, размер амплификата 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 амплификатов является метод агарозного гель-электрофореза, где размер ампликона должен быть больше 200 п.н. При увеличении размера ампликона до 1000 п.н. и больше полимеразы будет 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 бактерии. В результате проделанной работы были подобраны праймеры для амплификации *Citrobacter*: CitroF ttgtggtaataaccgcagca и CitroR acagttcccgaaggcaccctc. Здесь температура отжига составила 58⁰С, а размер ампликона 584 п.н. Также удалось подобрать праймеры для *Hafnia alvei*: HafF aaggccttcgggtgtgtaa и HafR agttcccgaaggcactaag. Температура отжига 57⁰С, а размер ампликона 625 п.н. Для *Klebsiella spp*: KlebF gggaccttcgggcctcatgccatcaga и KlebR tctcacagttcccgaaggcaccaa. Температура отжига 60⁰С, размер ампликона 843 п.н. Для *Proteus spp*: ProtF ggcgggccccctggacaaagac и ProtR tctcagcgttcccgaaggcactcct. Температура отжига 60⁰С, размер ампликона 315 п.н. Для *E. coli*: ColEF agctaataaccgcataacgtcgcaagaccsaaagagg и ColER tctcacggttcccgaaggcacattctcatct. Температура отжига 62⁰С, размер ампликона 878 п.н. Для *S. Aureus*: SauF gttaaccctgcgcccagacaat и SauR acttcaagcatcagcaggagacag. Температура отжига 54⁰ С, а размер ампликона 474 п.н. Для *P. aeruginosa* : PaeF tatggccgcttcctcgtcttctcc и PaeR agttcgcggttctgtcgttctc. Температура отжига 65⁰ С, а размер ампликона 306 п.н.



Рисунок 1. Электрофореграмма результатов проверки наличия ДНК при выделении его из клинических образцов.

Как видно из электрофореграммы ДНК в коралловидных камнях есть, но в малом количестве.

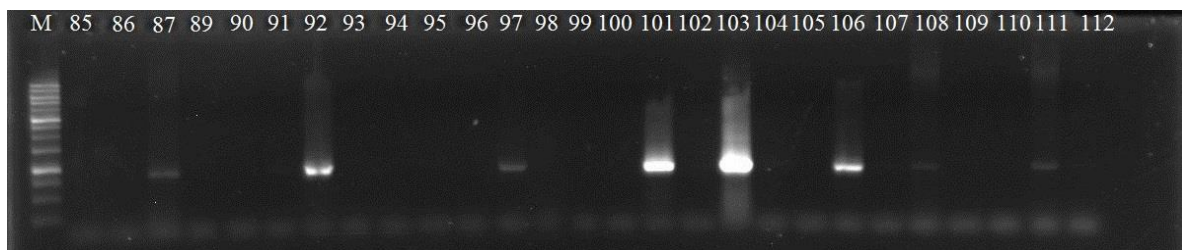


Рисунок 2. Электрофореграмма результатов ПЦР *Klebsiella pneumoniae*. Размер ампликона 843 п.н.

Были исследованы 138 образцов и в 12 образцах найдена следовая ДНК *Klebsiella pneumoniae*. Значит подобранные праймеры полностью подходят для ПЦР-анализа. Поэтому они могут быть использованы для создания диагностических систем в будущем.

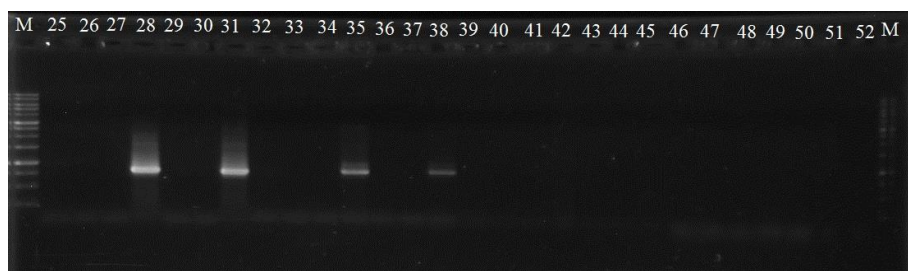


Рисунок 3. Электрофореграмма результатов ПЦР *Escherichia coli* (метод солевой экстракции). Размер ампликона 850 п.н.

При исследовании 138 образцов ДНК *Escherichia coli* обнаружена в 4 образцах.

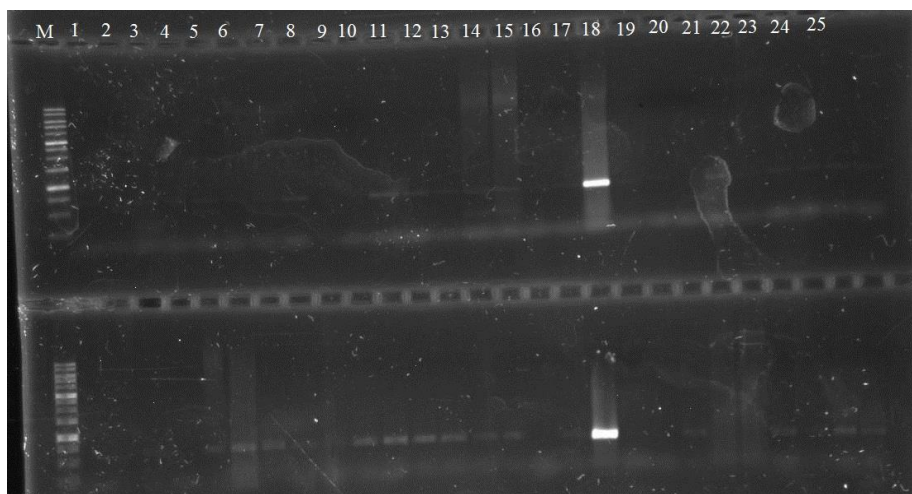
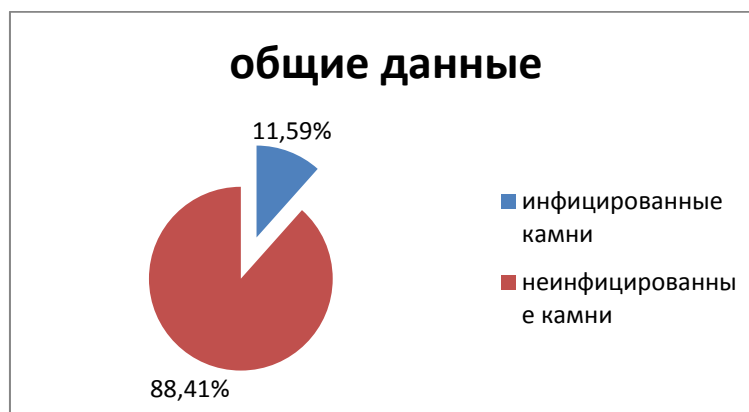


Рисунок 4. Электрофореграмма результатов ПЦР *S.aureus*.и *P. aeruginosa*. Размер ампликона *S.aureus* 474 п.н. Размер ампликона *P. aeruginosa* 306 п.н. Метод солевой экстракции.

При исследовании 138 образцов камней *S. aureus* и *P. aeruginosa* были обнаружены в двух образцах. Это можно объяснить воспалительным процессом.

Все ПЦР были проведены успешно и далее были использованы для оптимизации условий реакций, которые в основном были направлены на уменьшение времени реакции. Для этого мы увеличивали температуру отжига и во всех случаях удалось его довести до 63⁰С. Так же мы уменьшали время элонгации и довели его до 15 секунд, то есть этого времени было достаточно для получения полноразмерного ампликона, хорошо видимого в агарозном геле. В дальнейшем мы также вели работы по уменьшению количества добавляемой полимеразы и нуклеотидов, чтобы сократить расходы на реактивы при постановке ПЦР. Таким образом, нами созданы и испытаны на клиническом материале диагностические системы для типирования при помощи ПЦР таких условно-патогенных энтеробактерий как *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *E.*

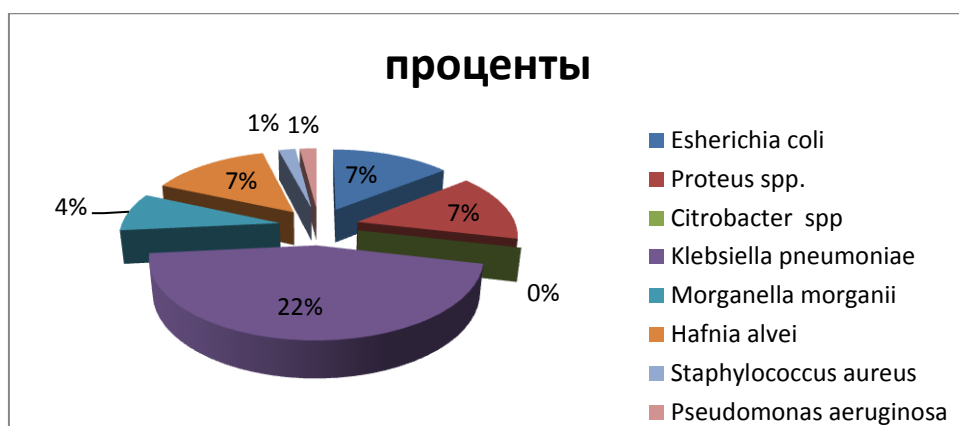
coli, *Hafnia alvei*, *Citrobacter* spp. Также оптимизированы условия ПЦР, что позволяет проводить реакцию в течение 40-50 минут.



Данная диаграмма показывает, что из 138 коралловидных камней, ДНК бактерий удалось обнаружить только в 12 образцах. Это составило 11,59%. Большая часть камней была образована либо из-за нарушения обмена веществ, либо другими бактериями.



По данной диаграмме можно сделать вывод, что женщины чаще подвержены мочекаменной болезни. Это может быть связано с тем, что женщины больше подвержены дисбактериозу бактериальной природы.



Как видно из диаграммы, в анализируемом нами клиническом материале условно-патогенные энтеробактерии обнаруживались чаще других бактерий. Наименьшее число раз был обнаружен *Citrobacter spp.* Из условно-патогенных энтеробактерий наиболее представленными оказались *Klebsiella spp.* Однако следует отметить, что эти данные никак не могут отражать реальную значимость в образовании мочевых камней, так как ДНК в образцах выделялась в разных количествах и разного качества. К тому же некоторые пары праймеров могут работать более эффективно, а другие хуже.

Обсуждение результатов

Мочекаменная болезнь частое заболевание. Нередко оно возникает вследствие наличия в мочевыводящих путях условно-патогенных бактерий. По результатам данной дипломной работы можно сказать, что коралловидный нефролитиаз встречается чаще у женщин. Это подтверждает данные статьи Medina-Polo J. По данным этой статьи мочекаменная болезнь встречается у 52%.

Чаще всего обнаруживались бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Что подтверждает данные приведённые в статье Medina-Polo J. Скорее всего это связано с тем, что в мочевыводящих путях много условно-патогенных бактерий, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae*.

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa* встречаются чаще всего из-за наличия воспаления и к камнеобразованию не причастны.

Возможно бактерии изменяют pH мочи ферментами, что приводит к повышению концентрации солей в моче. Это и запускает процесс камнеобразования. А ДНК бактерий является следовой и в самих камнях бактерий нет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью работы являлось идентификация бактерий мочевых камней. Для этого удобно использовать ПЦР с двумя специфическими праймерами.

Из образцов мочевых камней методом солевой экстракции нам удалось выделить следовую ДНК в малых количествах. Но этого хватило для проведения ПЦР-анализа. Были обнаружены ДНК условно-патогенных энтеробактерий, преимущественно отнесенных к 4 видам: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* и *Hafnia alvei*. Для идентификации видового состава энтеробактерий были подобраны праймеры для таких родов как *Citrobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella* и *Proteus*. Подобранные праймеры сработали у четырёх родов: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Hafnia*. Праймеры для *S. aureus* и *P. aeruginosa* тоже сработали, но только в двух образцах. Мы считаем, что это связано с малым количеством следовой ДНК на мочевых камнях. В ходе ПЦР нам также удалось оптимизировать условия реакции, повысив температуру отжига до 65°C во всех случаях и доведя время элонгации до 15 секунд.

Выводы

1. Для лучшей сохранности ДНК в нативном виде при выделении его из коралловидных камней лучше использовать ступку с пестиком и жидкий азот вместо ДНК-гомогенизатора.
2. Показано, что наиболее эффективным методом выделения тотальной ДНК из мочевых камней является метод солевой экстракции.
3. Методом ПЦР-анализа было показано, что наиболее часто в мочевых камнях встречается ДНК *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp., *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*.
4. Относительно частое обнаружение ДНК *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp., *Escherichia coli*, *Hafnia alvei* в мочевых камнях может свидетельствовать об этиологической роли данных микроорганизмов в индуцировании и развитии мочекаменной болезни.

Список литературы

1. Акатов А. К., Зуева. В.С. Стафилококки- М.: Медицина, 2006. -256с.
2. Актуальные проблемы клинической микробиологии (сборник научных трудов) НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи. - М., 2010. -470 с.
3. Белясова, Н.А. Микробиология: Учебник, 2012. - 443 с.
4. Бухарин О.В., Литвин В.Ю., Патогенные бактерии в природных экосистемах, 1997. – 270 с.
5. Бухарин О.В., Усвятцов Б.Я., Персистенция патогенных бактерий, 1996, - 208 с.
6. Вершигора А.Е. Общая иммунология. - Киев, 1990, - 270 с.
7. Второе издание Руководства Берджи, 2001, - 800 с.
8. Габрилович И.М., Бозиев В.Б., Гайрабеков Р.Х. и др. Тиолзависимые гемолизины у условно-патогенных энтеробактерий // 2-я Всес. конфер. «Бактериальные токсины». Тезисы. Юрмала. Латвия. -1989.-С.24.
9. Глыбочко В.П., Аляев Ю.Г., Практическая урология, 2011 – 270 с.
- 10.Гордейчик, В.И. Основы микробиологии, санитарии и гигиены: Учебное пособие, 2010. - 199 с
- 11.Езепчук Ю.В., Токсины и анатоксины, 1985. – 240 с.
- 12.Иммунология инфекционного процесса. Руководство для врачей, под ред. В.И. Покровского, С.П. Гордиенко, В.И. Литвинова. - М., 1994. – 308 с.
- 13.Истратов, В. Г. Патогенетические факторы развития мочекаменной болезни, Материалы XIII конгресса Российского общества урологов. - М.; 2013. - С. 292
- 14.Клиническая микробиология. / Донецкая Э.Г.-М.: Медицина, 2002, - 270 с.
- 15.Комяков Б.К. Урология: учебник. 2011. - 464 с.: ил.

16. Лопаткин Н.А. и соавт. учебное пособие :Урология, 2013, 460с
17. Микробиология и иммунология./ Под ред. А.А. Воробьева. - М.: Медицина, 2010 и др. годы издания. – 464 с.
18. Микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов /Под ред. В.Н. Царева. - М.: Практическая медицина, 2010 - 581 с
19. Микробиология./ Под ред. А.А. Воробьева. - М.: Медицина, 2005 и др. годы издания. – 232 с.
20. Мнацаканов С.Т. Энтеротоксигенность условно-патогенных энтеробактерий при острых кишечных заболеваниях у детей. – 257 с.
21. Мнацаканов С.Т. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. -1983. -№6.-С. 53-55.
22. Патогенные ферменты бактерий/ Ю. В. Галаев. -М.: Медицина, 1968. – 116 с.
23. Пашкова Т.М., материалы всероссийской научно-практической конференции, 2016. – 247 с.
24. Перепанова Т.С., VII Всероссийская научно-практическая конференция Рациональная фармакотерапия в урологии – 2013.
25. Перепанова, Т. С. Роль инфекции мочевых путей в генезе камней, Материалы XIII конгресса Российского общества урологов. - М.; 2013. - С. 304.
26. Подколзина В. А., Седов А. А. Медицинская микробиология. Конспект лекций. М.: Приор, 2005. – 46-57 с.
27. Тиктинский О.Л. учебное пособие «Мочекаменная болезнь», 2005г, 360с
28. Тиктинский О.Л. учебное пособие «Мочекаменная болезнь», 2010 , 280с
29. Урология : учебник / Б. К. Комяков. - 2012. - 464 с.: ил.
30. Урология : учебник С.Х. Аль-Шукри, В.Н. Ткачук ; 2012. - 480 с. : ил.
31. A.S.RAO, Introduction to Microbiology.: New Delhi, 2006, P 216.

32. Basavaraj Makanur, V. K. Deshpande and B. S. Vyakaranahal Department of Seed Science and Technology, University of Agricultural Sciences, Dharwad - 580 005, Karnataka, INDIA. 2013, -: 1183-1188 p.
33. Daudon, M. Epidemiology of urolithiasis 2011- Vol. 61, suppl. 3. - P. 372-378
34. Dr. Kevin G Campbell's UROLOGY, 2012;
35. European Association of Urology// Guidelines, 2012. – 163 p.
36. Ford Michael, Medical Microbiology.: Oxford University Press, 2006, 364 p.
37. Harvey Richard A.. Microbiology. Third edition. - Baltimore, 2013, P 224.
38. Jones & Bartlett Learning Announces Antibiotic Essentials, Tenth Edition -- New for 2011.
39. Ken S Rosenthal, Michael J Tan, Microbiology and Immunology, third edition.: Philadelphia 2011, 240 p.
40. Kok, D. J. Calcium oxalate nephrolithiasis, free or fixed particle disease 2004. – Vol. 46, N 3. – P. 847-854
41. Kumaresan Veliah, Medical Microbiology MCQs, Second Edition, 2005, 200 p.
42. Lansing M Prescott, John P Harley, Donald A Klein, Microbiology.: McGraw-Hill Higher Education, 2005, 1135 p.
43. Lecture Notes, Urology. John Blandy, Amir Kaisary.// Willey-Blackwell 2009, 287 p .
44. Macfarlane Michael T.. Urology, First Edition.// Lippincott and Williams, 2013 P 306.
45. Murray Patrick R., Ken S. Rosenthal, Michael A, Phaller. Medical Microbiology// Philadelphia 2009, P 848.
46. Ordon M., R. Saskin, M. Mamdani et al. J. of Endourology: Ordon, M. Surgical management of kidney stone disease: a population-based time series analysis, 2012, p 98
47. Pommerville J.C., Alcamo's Laboratory Fundamentals of Microbiology. 2011, 915 p.

48. Prywer, Torzewska. *Proteus* sp. – an opportunistic bacterial pathogen – classification, swarming growth, clinical significance and virulence factors/ 2009.
49. Romanova Y. M. et al. *Microbial Communities on Kidney Stones*, 2014. 78-84 p.
50. Schmidt I., W.C. Bacteriophage typing of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* and *Proteus morganii* / W.C. I. Schmidt, C.D. Jeffries // *Appl. Microbiol.*, 1974, P 47-53.
51. Tavichakorntrakool et al., *Investigating the Potential of Escherichia coli to Promote Kidney Stone Formation* / 2012, P 214.
52. *Textbook of Microbiology and Immunology*, Subhash Chandra Parija.: Elsevier 2009, P 682.
53. Tom Elliot, *Medical Microbiology and infection, Lecture Notes.*: - Blackwell Publishing Ltd, 2011, P 33.
54. Torzewska A1, Rozalski A. *Classification and environmental distribution of Proteus rods* // 2011, P 96.
55. Ulrike Gerischer, *Acinetobacter Molecular Microbiology.*-Caister Academic Press: Norfolk, UK 2008, P 484.

приложение

Справка на Антиплагиат студентки МБ 401 Б Павловой А.А.

Информация о документе:

Имя исходного файла: проверка.docx
Имя компании: Башкирский государственный медицинский университет

Тип документа: Прочее
Имя документа: Диплом Павловой
Дата проверки: 23.06.2016 8:58
Модули поиска: Диссертации и авторефераты РГБ,
Интернет (Антиплагиат), Кольцо вузов,
Модуль поиска ЭБС "Лань"

Текстовые статистики:

Индекс читаемости: сложный
Неизвестные слова: в пределах нормы
Макс. длина слова: в пределах нормы
Большие слова: в пределах нормы

Оригинальные блоки: 78.82%
Заимствованные блоки: 21.18%
Заимствование из "белых" источников: 0%
Итоговая оценка оригинальности: **78.82%**



Отзыв научного руководителя с места дипломной практики

Павлова Анастасия Алексеевна проходила дипломную практику в лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН с 2015 года по 2016 год. За это время она освоила следующие методы молекулярной биологии: выделение ДНК, агарозный гель-электрофорез, ПЦР. Так же освоила методы дробления мочевых камней, без повреждений ДНК.

Она добросовестно выполняла все порученные задания. Проявила себя как заинтересованный специалист, зарекомендовала себя с положительной стороны, нарушений правил внутреннего трудового распорядка не допускала. Замечаний к практиканту нет.

Научный руководитель



д.б.н. Кулуев Б.Р.

Подпись: Кулуева Б.Р.
Исполнительный директор, Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимии и генетики
Уфимского научного центра Российской академии наук
Ф.Р. Гималетдинов



РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки Павловой А.А.

Медико-профилактического факультета с курсом микробиологии

Башкирского государственного медицинского университета

Тема: «Микробиота коралловидных камней, образующихся при

мочекаменной болезни ».

Рецензируемая работа посвящена разработке методов выделения ДНК из коралловидных камней почек и обнаружении бактерий методом ПЦР-анализа. Дипломная работа построена по классической схеме. Полученные результаты могут быть применены в урологии при диагностики мочекаменной болезни. Идентификацию бактерий проводили молекулярными методами.

Дипломная работа Павловой А.А. удовлетворяет всем предъявляемым требованиям дипломной работы, может быть допущена к защите и заслуживает положительной оценки.

высший научный сотрудник
ЦНИЛ

д.м.н., профессор Фархутдинов Р.Р.



РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки Павловой А.А.
Медико-профилактического факультета с курсом микробиологии
Башкирского государственного медицинского университета
по теме «Микробиота коралловидных камней, образующихся при
мочекаменной болезни»

Рецензируемая работа посвящена разработке метода выделения ДНК бактерий коралловидных камней. Амплификация ДНК осуществлялась при помощи ПЦР. Актуальность темы, полученные результаты имеют важную практическую ценность в области урологии для диагностики мочекаменной болезни. Дипломная работа построена по традиционной схеме, включает введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследований, представление собственных данных и их обсуждения. Особенность данной работы заключается в том, что была проведена идентификация бактерий используя только методы молекулярной генетики.

Дипломная работа Павловой А.А. удовлетворяет всем предъявляемым требованиям, может быть допущена к защите и заслуживает положительной оценки.

научный сотрудник
лаборатории молекулярной биологии
и нанобиотехнологии



к.б.н. Иванова Е.С.

