

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

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

Сафиуллина Эльвира Илдусовна

**Молекулярно-генетическая характеристика
патогенного потенциала энтеробактерий,
выделяемых при гнойно-воспалительной и
раневой патологии**

Руководитель:
д.б.н. () Б.Р.Кулеев

Уфа – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень условных обозначений (сокращений)	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность проблемы.....	5
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1. Роль энтеробактерий в развитии гнойно-воспалительной и раневой патологии.....	8
1.2. Классификация гнойно-воспалительных инфекций. Этиология, патогенез и клиника.....	10
1.3. Общая характеристика энтеробактерий и их свойства.....	14
1.3.1. Род <i>Escherichia</i>	17
1.3.2. Род <i>Proteus</i>	19
1.3.3. Род <i>Klebsiella</i>	20
1.4. Методы идентификации энтеробактерий.....	22
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	24
2.2. Выделение бактериальной ДНК.....	24
2.3. Подбор олигонуклеотидных праймеров.....	25
2.4. Амплификация участков ДНК геномов микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции.....	27
2.5. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле.....	29
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	31

3.1. Испытание разработанных тест-систем для ПЦР-идентификации условно-патогенных <i>Enterobacteriaceae</i>	31
3.2. Анализ представленности уропатогенных <i>Enterobacteriaceae</i> в исследуемом клиническом материале.....	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	46
ВЫВОДЫ.....	47
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	48

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИКМТ – инфекция кожи и мягких тканей

ЛПУ — лечебно-профилактическое учреждение

БЛРС – бета-лактамазы расширенного спектра

РФ – Российская федерация

ГВЗ – гнойно-воспалительные заболевания

ЛПС – липополисахарид

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ОКЗ – острое кишечное заболевание

ЭЭ – энтеропатогенные эшерихии или

ЭПКП – энтеропатогенные кишечные палочки

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

С гнойными инфекциями человечество знакомо с давних времен и ведет с ней войну уже почти 2,5 тысячи лет. Гнойно-воспалительные заболевания представляют тяжелую нерешенную проблему для медицины.

Гнойные инфекции поражают всевозможные ткани и органы, имеют различный характер, вызываются гноеродной флорой и сопровождаются воспалительной реакцией с образованием гнойного экссудата. Чаще всего эти заболевания поражают людей с ослабленными защитными свойствами организма, часто являются вторичными инфекциями, возникающими в условиях стационара, которые называются госпитальными инфекциями. Уровень заболеваемости госпитальными инфекциями колеблется в пределах от 5 до 500 на 10000 госпитализированных.

Гнойные процессы сопровождаются развитием инфильтратов, флегмон, абсцессов, воспалений в различных полостях, в суставах, костях и.т.п. Инфекции кожи и мягких тканей – служит наиболее частой причиной обращения пациентов в медицинские учреждения за хирургической помощью. В США ИКМТ становятся поводом около 330 000 госпитализаций в год [2]. По оценкам исследователей, каждый год в РФ гнойная инфекция мягких тканей поражает более 700 тысяч госпитализированных [1]. Течение гнойно-воспалительных заболеваний колеблется от легких местных поражений до тяжелой генерализованной инфекции. По характеру протекания ГВЗ определяют острую и хроническую инфекцию, она имеет локальный или общий характер[6, 9].

Раневые инфекции - инфекционные процессы, развивающиеся в ранах в результате проникновения в них патогенных микроорганизмов. Развитие инфекционного процесса провоцирует ослабление защитных

реакций организма, массы дозы заражения и степени способности инфекционного агента заражать данный организм. Раневые инфекции часто имеют гнойный характер и являются отдельным случаем ГВИ, подчиняясь тем же закономерностям. Инфекции осложняют течение раневого процесса, препятствуют регенерации ран первичным натяжением, нередко сопровождаются тяжелой интоксикацией с травматическим истощением организма, генерализацией инфекции с развитием сепсиса, что может привести к летальному исходу. Возбудители гноинвоспалительных, септических и раневых инфекций [9].

В настоящее время важно учитывать значительные изменения в структуре возбудителей воспалительных гноинных процессов, в частности тот факт, что на первое место выдвинулась проблема условно патогенных микроорганизмов, среди которых возрастает значение условно-патогенных энтеробактерий. Наиболее частыми при этом обнаруживаются *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, и некоторые другие. Для своевременной коррекции подходов к лечению необходим непрерывный мониторинг эпидемической ситуации, в частности в стационарах. При определении таксономического положения патогенных и условно-патогенных бактерий большое значение имеет разработка ускоренных и наиболее доступных способов изучения характеризующих их свойств. Так как своевременно поставленный этиологический диагноз—это не только снижение стоимости лабораторного исследования, но и вовремя назначенная целенаправленная терапия, уменьшение внутрибольничных инфекций, снижение продолжительности пребывания больного в стационаре. В связи с этим представляется перспективным применение полимеразной цепной реакции [10, 11, 27, 28, 30,].

Объектом исследования были образцы клинического материала (гной), выделенные от 56 больных, страдающими гноинвоспалительными инфекциями и раневой патологией.

Исходя из актуальности и практической значимости проблемы

изучения гноеродных энтеробактерий целью работы являлась **молекулярно - генетическая характеристика видового состава микробиоты при различных гнойно-воспалительных заболеваний и оценка роли в этом процессе условно - патогенных энтеробактерий.**

Для достижения цели работы были сформулированы следующие задачи:

1. Сбор коллекции клинических образцов у больных с гнойно-воспалительной и раневой патологией.
2. Выделение тотальной ДНК из клинических образцов.
3. Подбор и синтез праймеров, обеспечивающих видовую идентификацию энтеробактерий различных видов.
4. Подбор оптимальных условий для ПЦР.
5. Определение видового состава энтеробактерий в клинических образцах при помощи метода ПЦР.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Роль энтеробактерий в развитии гнойно-воспалительных инфекций и раневой патологии

Несмотря на развитие хирургии, в наши дни проблема профилактики и лечения комплексных инфекционных гнойных инфекций мягких тканей по прежнему остается в списке актуальных [3, 18].

В последние годы во всех направлениях наблюдается рост удельного веса различных инфекционных заболеваний, возбудителями которых являются ассоциации условно-патогенных грамотрицательных бактерий. На сегодняшний день данные микроорганизмы являются наиболее часто обнаруживаемыми возбудителями гнойных инфекций [13, 35, 41]. ГВИ человека имеют определенный характер, отличающийся хорошо представленным клиническим полиморфизмом, возникающим с одновременным воздействием множества этиологических агентов, каждый из которых имеет в своем арсенале несколько факторов патогенности [44].

В ЛПУ России актуальной проблемой является широкое распространение грамотрицательных энтеробактерий, которые могут проявлять антибиорезистентность к цефалоспоринам в виду продукции ими бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС). Наиболее часто при выявлении возбудителя из клинического материала (гноя) при гнойно-воспалительных инфекциях и раневой патологии обнаруживаются кишечная палочка, а так же представители родов протея и клебсиеллы [2, 10].

Особого внимания заслуживают полимикробные гнойные процессы, вызванные протеями, энтеробактериями, которые в 10-15 % случаев оканчиваются неблагоприятно [16, 24, 49]. Высока летальность и при смешанных инфекциях в значительной мере связана с взаимным индуцированием факторов патогенности и доминированием среди

возбудителей, энтеробактеров и протеев устойчивы к нескольким антибиотикам одновременно штаммов. Вследствии, существующие методы лечения часто оказываются неэффективными, следовательно появляется острая нужда в разработке новых методов в профилактике, диагностике и лечении гнойно-воспалительных инфекций, причиной которых является смешанная условно-патогенная микрофлора [8].

В хирургическом стационаре нередко возникают внутрибольничные госпитальные инфекции. Под данным понятием подразумевается заражение больного существующей в стационаре флорой, вирулентной и обладающей полирезистентностью к антибиотикам. Современная госпитальная инфекция вызывается в основном условно-патогенными грамотрицательными микроорганизмами [17, 26].

Также представители *Enterobacteriaceae* могут вызывать сепсис. Сепсис – инфекционное заболевание, вызываемое различными возбудителями, которое развивается у лиц с резко сниженными защитными силами организма. В конце XX века в США регистрируется 700 тыс. случаев сепсиса. Летальность в 40-50%. Грамположительные бактерии обнаружаются в 31% случаев. Из энтеробактерий наиболее часто выявляют *E. coli* - 56%, *Klebsiella* - 27%, *Proteus* - 6%, *Pseudomonas aeruginosa* - 3%, др. - 8%. [22].

Любые гноеродные микробы, проникшие в полость сустава, могут стать причиной воспаления суставных элементов или сустава в целом. Причиной неспецифического инфекционного артрита иногда становятся бактерии *E. coli* и *Enterobacter* [8].

Неблагоприятное течение энтеропатогенных хирургических заболеваний в большей части обнаруживается у тяжело больных детей в первые годы жизни при отсутствии у них эффективности традиционного этиопатогенетического лечения, что приводит к развитию тяжелого сепсиса [42, 46]. Множество вторичных перфоративных перитонитов возникает у людей в детском возрасте. Это спонтанные бактериальные

перитониты, проявление пsoas-абсцесса, разрыв абсцесса печени новорожденных, некротирующий энтероколит [34, 37, 39, 43,]. При изучении бактерий новорожденных *Enterobacter cloaceae* обнаруживают как причину развития распространенного гнойного перформативного перитонита [33, 50].

При всем видовом разнообразии раневой микрофлоры ведущую роль в возникновении и развитии гнойно-воспалительных заболеваний и осложнений в хирургии и оториноларингологии играет грамположительная микрофлора, представленная в основном стафилококками [25]. Однако при исследовании ожоговых ран больных с гнойно-воспалительными заболеваниями энтеробактерии были выявлены в 50,6% проб [14].

Представители семейства *Enterobacteriaceae* становятся частыми возбудителями острой пневмонии. Во всем мире пневмонии занимают 4-5 место в структуре причин смерти у взрослой части населения, а среди инфекционных болезней 1-е место [32].

1.2. Классификация гнойно-воспалительных инфекций.

Этиология, патогенез и клиника

И по сей день в клинической практике часто применяется классификация хирургических инфекций, базирующаяся на разделение гнойно-воспалительных процессов по самым различным принципам (предложена В. И. Стручковым с соавт. в 1984 г.). Согласно этой классификации, гнойно-воспалительные процессы подразделяют на категории:

по клиническому течению:

- острая хирургическая (гнойная) инфекция - общая (генерализованная), сепсис, и местная.
- хроническая хирургическая (гнойная) инфекция - общая (сепсис) и местная;

по локализации:

- гнойно-воспалительные процессы кожи и подкожной жировой клетчатки;
- гнойно-воспалительные процессы покровов черепа, мозга и его оболочек;
- гнойно-воспалительные процессы шеи;
- гнойно-воспалительные процессы грудной стенки, плевральной полости, легких, органов и клетчаточных пространств средостения (торкальная инфекция);
- гнойно-воспалительные процессы органов брюшной полости и брюшины(интраабдоминальная инфекция);
- гнойно-воспалительные процессы органов и клетчаточных пространств таза;
- гнойно-воспалительные процессы мягких тканей конечностей и суставов;

по этиологии:

- стафилококковая инфекция;
- стрептококковая инфекция;
- пневмококковая инфекция;
- энтеробактериальная инфекция;
- синегнойная инфекция;
- гонококковая инфекция;
- неклостридиальная (неспорообразующая) анаэробная инфекция;
- клостридиальная (облигатная, спорообразующая) анаэробная инфекция;
- смешанная инфекция и др [7].

К гнойно-воспалительным заболеваниям относят:

- фурункул , эктиму, другие пиодермии;
- карбункул ;
- гидраденит ;

- лимфаденит и лимфангоит;
- эризипилоид;
- нагноение атеромы;
- абсцесс;
- панариций, паронихий, пандактилит ;
- гнойный тендовагинит;
- вросший ноготь;
- гнойный бурсит;
- гнойный хондроперихондрит;
- парапроктит;
- эпителиальный копчиковый ход;
- мастит ;
- нагноение кисты урахуса , срединной и боковой кисты шеи, других кист мягких тканей;
- флегмону.

Прогрессирование гноино-воспалительного процесса возникает в следствие близкого контактная микроорганизмов с макроорганизмом и проявления ответной местной или системной воспалительной реакции макроорганизма на внедрение инфекционного агента. Степень эксплицированности данного ответа детерминирован генетически и зависит от реактивности организма на момент инфицирования возбудителем, характера и экстенции повреждения тканей (при травме или операции), степени их кровоснабжения, а также вирулентности микроорганизмов и их численности. Критической дозой, способной образовывать гноиное воспаление, является присутствие в очаге инфекции микроорганизмов количеством более 10^5 [8].

Воспалительный процесс образовывается из трех взаимосвязанных процессов:

- а) повреждение элементов клетки в патологическом очаге (альтерация);

б) нарушение кровообращения и проницаемости сосудов микроциркуляторного русла с переходом из крови в ткани жидкости, белков, форменных элементов крови (экссудация);

в) размножение клеток (пролиферация).

При инфекциях вызванными бактериями разрушение тканей обычно не происходит; клинические проявления заболевания (гиперемия, боль) указывают на ответную реакцию организма, ориентированный на возрождение гомеостаза. В связи с этим изучение изменения структуры клеток как 1-ой фазы воспалительной реакции несет не столько практический, сколько теоретический смысл. С точки зрения клиники, ведущую роль имеет 2-ая фаза воспаления, вернее — экссудация.

Традиционно выделяют четыре стадии расстройства кровообращения в очаге воспаления:

- 1) недолговременное сужение артериол;
- 2) увеличение артериол, капилляров и венул;
- 3) застой кровообращения и лимфообращения;
- 4) процесс стаза.

При инфекциях бактериального происхождения сразу после заражения патогенными микроорганизмами в тканях происходит уменьшение артериол. Настоящий феномен универсальный и оценивается как защитная реакция макроорганизма, объединенный с освобождением катехоламинов. В дальнейшем наблюдается расширение сосудов микроциркуляторного русла и увеличение проходимости их оболочек, как для негустой крови, так и для сывороточных белков. Может возникать расстройство микроциркуляции в районе воспаления сопряжено с преобразованием главного вещества составляющих сосудов, а также активизацией протеолитических ферментов и тканевых гиалуронидаз.

Роль возбуждающих механизмов релаксации гладкой мускулатуры в стенках кровеносных сосудов, ее «внутренних двигателей» исполняют биологически активные вещества — гистамин, серотонин, плазменные

кинины, продукты распада ДНК и РНК, гиалуронидаза, простагландины. Гистамин играет ведущую роль среди всех установленных на сегодня медиаторов воспаления. При проведении экспериментальных опытов было выявлено, что гистамин — первая вазоактивная субстанция, выявляющаяся следом за повреждением тканей.

Он не только меняет капиллярный кровоток и смягчает прохождение разнообразных веществ через стенку сосудов, но и умножает уение эндотелия капилляров накапливать а на поверхности инородные вещества, коллоиды, холестерин. Избыток кининов усложняет неподвижность форменных элементов крови, повышает проходимость сосудов.

Следовательно в поражаемых тканях и брюшной полости образуются скопления мутного, богатого белком (3 - 8%) раствора - гнойный экссудат.

Экссудация жидкости и солей из кровеносного русла в интерстициальное пространство приводит к снижению объема циркулирующей плазмы, повышению величины гематокрита, изменению белкового спектра крови. Данные перемены приводят к изменению вязкости и текучести крови, повышенному объединению тромбоцитов и эритроцитов, развитию ДВС-синдрома со скапливанием фибрина в пространство вне сосудов и в сосуды поврежденного органа. Фибрин отгораживает очаг воспаления, препятствует распространению инфекции по различным сосудам. Клиническая картина ГВИ в значительной степени определяется свойствами возбудителя [21].

1.3. Общая характеристика энтеробактерий и их свойства

К семейству энтеробактерий относятся микроорганизмы, для существенного большинства которых естественной средой обитания служит желудочно-кишечный тракт человека или позвоночных животных.

В семейство включается более 30 родов. Наиболее патогенными для человека являются представители *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*,

Proteus, *Klebsiella*, *Yersinia* и др., рода подразделяются на виды и в некоторых случаях на биовары.

Бактерии данного семейства *Enterobacteriaceae* представляют собой палочки, т.е имеют цилиндрическую форму, обычно небольшого размера, для окраски применяются анилиновые красители, грамотрицательны.

Многие из них имеют перитрихиально расположенные жгутики и имеют капсулу или микрокапсулу, в связи с чем нередко ведут подвижный образ жизни. Спор не образуют. Многие культуры, принадлежащие к разным родам энтеробактерий (эшерихиям, сальмонеллам, клебсиеллам, протеям, шигеллам) имеют на поверхности клеточной стенки пили (ворсинки), с которыми связаны их адгезивные способности. Все энтеробактерии являются факультативными анаэробами, интенсивно размножаются на средах, имеющих в своем составе мясной экстракт.

Отличительным признаком энтеробактерий является способность к ферментации глюкозы (и др. углеводов) с выделением кислоты и газа. По характеру отношения к лактозе их подразделяют на лактоза - ферментирующие и лактоза -неферментирующие. Каталаза - положительны, способны к восстановлению нитратов в нитриты.

Данные признаки имеют таксономическое значение, определение отличий в перечисленных признаках применяют для родового и видового разделения и идентификации энтеробактерий. Определенные признаки используются для разделения на биовары одного и того же вида бактерий.

К основным биохимическим признакам, служащими для определения родовой и видовой принадлежности энтеробактерий, относят их способность ферментировать различные углеводы до образования кислоты или газа, образование индола, сероводорода, декарбоксилаз аминокислот, разложения цитрата и др. [4, 40].

В настоящее время большее признание нашла классификация семейства *Enterobacteriaceae*, представленная в "Кратком определителе

бактерий Берджи", М., 1980 г. (см. таблицу 1) [15].

1) Триба	2) Род	3) Вид (подрод)
I. <i>Escherichiae</i>	1. <i>Eccherichia</i> 2. <i>Edwardsiella</i> 3. <i>Citrobacter</i> 4. <i>Salmonella</i>	1. <i>E. Coli</i> 1. <i>E. Tarda</i> 1. <i>C. Freundii</i> 2. <i>C. Intermedius</i> 1. Подрод I (<i>S. choleraesuis</i> , <i>S. hirschfeldii</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. paratyphi A</i> , <i>S. schotmuelleri</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. gallinarum</i>) 2. Подрод II (<i>S. salamae</i>) 3. Подрод III (<i>S. arizonae</i>) 4. Подрод IV (<i>S. houtenae</i>) 5. <i>Shigella</i>
II. <i>Klebsiella</i>	1. <i>Klebsielleae</i> 2. <i>Enterobacter</i> 3. <i>Hafnia</i>	1. <i>K. Pneumoniae</i> 2. <i>K. Rhinoscleromatis</i> 3. <i>K. Ozaenae</i> 1. <i>E. Cloacae</i> 2. <i>E. Aerogenes</i> 1. <i>H. Alvei</i>

III. <i>Proteae</i>	4. <i>Serratia</i>	1. <i>S. Marcescenc</i>
	1. <i>Proteus</i>	1. <i>P. vulgaris</i> 2. <i>P. mirabilis</i> 3. <i>P. morganii</i> 4. <i>P. rettgeri</i> 5. <i>P. inconstans A B</i>
IV. <i>Yersiniae</i>	1. <i>Yersinia</i>	1. <i>Y. pestis</i> 2. <i>Y. pseudotuberculosis</i> 3. <i>Y. enterocolitica</i>
V. <i>Erwiniae</i>	1. <i>Erwinia</i>	Группы 1. <i>Amylovora</i> (вкл. 6 видов) 2. <i>Herbicola</i> (вкл. 3 вида) 3. <i>Carotovora</i> (вкл. 4 вида)

Таблица 1 . Классификационная схема семейства *Enterobacteriaceae*

1.3. 1. Род *Escherichia*

Впервые эшерихии были выделены в 1885 г. Этерихом. Встречается огромное количество 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.

Морфологические и культуральные свойства. *E. coli* — палочки небольшого размера (0,5—1 мкм), неспорообразующие, грамотрицательны. Некоторые культуры способны к образованию

капсулы. Характерны наличием жгутиков, которые расположены по всей поверхности клеточной стенки (перитрих). Факультативный анаэроб, температурный opt — 37°C, pH — 7,2—7,8. *E. coli* к питательным средам неприхотлива и хорошо растет на простых средах. На твердых средах вырастает в виде слегка выпуклых колоний. Колонии мутные, слегка желтоватые.

E. coli является обладателем большого набора разнообразных ферментов. Наиболее значимым отличительным признаком *E. coli* от других микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* является ее способность ферментировать в течение суток лактозу.

E. coli прекрасно сохраняется во внешней среде. При температуре 60°C погибает в течение 15 мин; 1 % раствор лизола или 5 % раствор хлорамина — ведет к гибели через 10—15 мин. *E. coli* особенно устойчива к действию разнообразных факторов[19, 31].

Патогенез. *E. coli* подразделяется на условно-патогенные и патогенные штаммы. По патогенетическим и эпидемиологическим особенностям вызываемых *E. coli* заболеваний их можно разделить на две группы:

1. Возбудители эндогенных инфекций — ГВИ различной локализации. К ним относятся пиелиты, циститы, холициститы и др., за исключением нагноения ран.

2. Другие относятся к экзогенной инфекции, возникающей в основном в ассоциациях с другими бактериями (*Staphylococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa* и др.). Все упомянутые инфекции часто классифицируют как колибактериозы, возбудителями которых являются условно-патогенные микроорганизмы. *E. coli* при выраженном иммунодефиците способна вызвать сепсис. Являются основными возбудителями острых кишечных инфекций, которые представляют собой типичные инфекции, вызываемыми внешними причинами, называемые эшерихиозами (диареи). Они получили название - энтеропатогенные эшерихии (ЭЭ) или

энтеропатогенные кишечные палочки (ЭПКП). ЭПКП делятся на 4 группы:

- а) ЭПКП — возбудители коли-энтеритов, вызывающих сальмонеллоподобные инфекции;
- б) ЭТКП, вызывающие холероподобные инфекции;
- в) ЭИКП, вызывающие дизентериеподобные инфекции;
- г) ЭГКП, вызывающие геморрагический колит[4].

Антигенные свойства. В структуре поверхностных антигенов *E.coli* обнаруживают полисахаридные (O), капсульные (K) и жгутиковые (H) антигены[5, 36].

1.3.2. Род *Proteus*

Типовой вид *Proteus vulgaris*. Протей впервые был выделен Хаузером в 1885 году.

Морфологические и культуральные свойства.

Это грамотрицательные палочки. Для протеев характерно расположение в мазках парно или цепочками, так же являются неспорообразующими, подвижны. Капсулы отсутствуют, факультативные анаэробы. Хорошо растет на обычных питательных средах.

Во внешней среде обладают достаточной устойчивостью. При 60°C сохраняются около часа. Хорошо выдерживают низкие температуры. Имеют устойчивость к действию различных дезинфицирующих растворов.

Патогенез. Ведущим фактором патогенности протея служит способность образовывать уреазу. Бактерии разлагают мочевину в качестве источника питания, конечные продукты метаболизма (хлорид аммония) провоцируют местное воспаление и играют роль в образовании камней и застое мочи. «Роящиеся» бактерии способны к адгезии и паренхиме почечной ткани и эпителию мочевого пузыря.

Эти бактерии характеризуются повышенным синтезом уреазы и гемолизинов. На кровяном агаре гемолитическая активность появляется через 48 ч. При понижении защитных сил организма человека протеи

вызывают циститы, энтероколиты, воспаление среднего уха, сепсис, послеоперационное нагноение ран и т. д. Иммунитет после перенесенных болезней сохраняется непродолжительное время. Обнаружение протеев является наиболее простым в семействе энтеробактерий.

Они легко опознаются по способности давать вид «кроения» при росте на питательных средах и по характерному гнилостному запаху. Меры профилактики протейных заболеваний включает соблюдение санитарно-гигиенических правил: охрана воды и продуктов питания от загрязнения испражнениями и гнойным экссудатом.

Антигенная структура. У протеев выделяются О-, Н- и К-антителы. Соматический О-антителен термостабилен, Н-антителен — термолабилен. Род *Proteus* состоит из 5 видов, *Pr. vulgaris*, *Pr. mirabilis*, *Pr. morgani* (66 сероваров), *Pr. rettgeri* (45 сероваров), *Pr. inconstans* (156 сероваров). Небольшое количество представителей протеев относят к патогенным бактериям, остальные считаются условно-патогенными микроорганизмами. [19, 47]

1.3.3. Род *Klebsiella*

Название рода дано в честь Э. Клебса. К роду *Klebsiella* относят 2 вида: *Klebsiella pneumoniae* и *Enterobacter*. Первый вид подразделен на два подвида: *K. ozanae*, *K. rinoscleromatis*.

Морфологические и культуральные свойства. Представители вида *Klebsiella pneumoniae* — короткие, толстые, неподвижные грамотрицательные палочки, образуют выраженные полисахаридные капсулы. Клебсиеллы так же растут на простых питательных средах.

Ферментируют глюкозу с кислотой и газом и используют ее и цитрат в качестве единственного источника углерода, а аммиак — источника азота. Подвиды клебсиелл можно различить по биохимическим признакам. Клебсиеллы отличаются от других представителей семейства отсутствием жгутиков, не синтезируют орнитиндекарбоксилазу, ферментируют сорбит.

Определение разных видов клебсиелл происходит путем определения их неодинаковых свойствах ферментировать углеводы, образовывать уреазу и лизиндекарбоксилазу, утилизировать цитрат и др. признаков. На питательных следах рост клебсиелл характерен образованием слизистых колоний [4, 45].

Патогенез. Патогенность клебсиелл пневмонии детерминирована их адгезией, связанной с капсулным полисахаридом, пилями и белком наружной мембранны, дальнейшим ростом и колонизацией энteroцитов.

Капсула дает защиту микроорганизмам от действия фагоцитирующих клеток. При разрушении бактериальных клеток высвобождается эндотоксин (ЛПС). Более того, *K. pneumoniae* производят термостабильный энтеротоксин, улучшающий выпот жидкости в просвет тонкой кишки, что играет важную роль в патогенезе острых кишечных заболеваний, и мембранотоксин с гемолитической активностью.

Клебсиеллы нередко становятся причинами таких заболеваний как пневмонии, ОКЗ, риносклероми, озены. Также данные бактерии вызывают поражения мочеполовых органов, мозговых оболочек взрослых и детей, токсико-септические состояния и ОКЗ у новорожденных. Иногда клебсиеллы являются причиной инфекций в стационарах.

Для пневмонии, вызываемой *K. pneumoniae*, характерны образование плюральных очагов в дольках легкого с дальнейшим слиянием и ослизнением инфицированной ткани, в которой находится большое количество клебсиелл. Вероятно развитие гнойных очагов в других органах и развитие сепсиса. Склерома вызываемая *K. rhinoscleromatis*, поражает слизистую оболочку носа (риносклерома), носоглотки, трахеи, бронхов. В тканях развиваются гранулемы с последующим проявлением склеротических сдвигов. При озене, *K. ozenae*, поражает слизистую оболочку носовой полости и придаточных полостей с последующей атрофией носовых раковин и выделением секрета с резким неприятным запахом.

Антигенная структура. В клебсиеллах обнаруживаются К-антителы, О-соматические и деградированный О-антител (R-антител). Клебсиеллы классифицируют по капсулльному антигену, в связи с этим реакции агглютинации проводят, используя капсулльные бактерии. Для популяций клебсиелл, которые содержат К- и О-антителы, характерно наличие сероваров [19, 48].

1.4. Методы идентификации энтеробактерий

Семейство *Enterobacteriaceae* объединяет грам (-) анаэробные и факультативно анаэробные бактерии, неспорообразующие, капсулльные и бескапсулльные, подвижные или неподвижные, хорошо растут на простых питательных средах. Характерным признаком для представителей семейства является способность к ферментации глюкозы сопровождающимся образованием кислых или кислых и газообразных продуктов. Отношение к другим углеводам варьирует в зависимости от принадлежности к роду.

Энтеробактериям присуща способность восстанавливать нитраты, проявлять каталазную активность. Энтеробактерии отличаются отсутствием фермента цитохромоксидазы. Для выделения энтеробактерий из других семейств грамотрицательных бактерий используются основные тесты: тест на цитохромоксидазу, восстановление нитратов в нитриты, тест на каталазную активность и окислительно - ферментативный тест Хью-Лейфсона, который используется для определения биохимических реакций с углеводами [32].

Традиционный метод микроскопического исследования включает три основных этапа:

1—Посев исследуемого материала на чашки с дифференциальными диагностическими средами ;

2—Снятие отдельных колоний и накопление чистой культуры с первичной дифференциацией на комбинированных питательных средах;

3—Полная идентификация выделенной культуры по комплексу биохимических признаков, антигенной структуре, отношением к специфическим бактериофагам и антибиотикам.

Время проведения анализа составляет от 72 часов до 4-5 суток [38]. Традиционные методы идентификации возбудителей имеют ряд недостатков – затрата большого количества времени, определенная скорость деления клеток бактерий, относительная дороговизна метода, необходимость привлечения большого числа квалифицированных работников в силу сложности автоматизации аналитических процедур.

Кроме того, большая часть патогенных бактерий, в том числе представители анаэробной бактериальной флоры, являются трудно культивируемыми или некультивируемыми и фактически большинство клинических микробиологических лабораторий не имеют возможности продиагностировать данные виды бактерий, что является существенным недостатком.

Сегодня практика показывает, что совместное использование методов исследования белковых маркеров (всевозможные ИФА-тесты) с детекцией ДНК (ПЦР - диагностика) позволило заметно повысить совокупный диагностический потенциал клинико-лабораторного анализа.

Методы геномно-протономной характеристики патогенов, практикуемые наравне с классическим бактериологическим посевом, значительно увеличивают положительный исход диагностического поиска, в некотором роде, и благоприятствуют получению свежей информации как в сфере молекулярной биологии, так и в сфере расшифровки механизмов устройства патогенного потенциала и антибиотикорезистентности бактерий [49].

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Выделение бактериальной ДНК из клинического материала

Тотальную бактериальную ДНК выделяли из гноя, используя стандартные наборы для выделения ДНК («ДНК – сорб - АМ», Россия), перед началом работы отцентрифугировали материал в пробирке при 12 тыс. об/мин в течение 15 минут. Этот метод основан на сорбции ДНК на частичках силикогеля (SiO_2) в присутствии 4 - 6 М гуанидинтиоцианата.

Лизирующим агентом в данном случае служит Triton X100, содержащийся в лизирующем буфере в концентрации 0,5 - 1 %. В свою очередь гуанидинтиоцинат 4 - 6 М концентрации за счет своих хаотропных свойств также содействует разрушению клеток. Впоследствии при добавлении суспензии силикогеля на их частицах происходит сорбция нуклеиновых кислот (НК). При центрифугировании комплекс $\text{SiO}_2 + \text{НК}$ уходит в осадок, а надосадочную жидкость, содержащую все остальные компоненты клеток становится возможным удалить.

В ходе работы отбирали необходимое количество одноразовых пробирок, маркировали их. В каждую пробирку вносили по 20 мкл сорбента универсального (силикагель), предварительно ресуспендируя его. После чего во все пробирки добавляли по 300 мкл лизирующего раствора (5М гуанидинтиоцинат, 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 ресуспенсирования 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 ресуспенсирования 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 проведению 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 acagttcccgaaggcaccctc. Расчетная температура отжига составила 58°C, а размер ампликона 584 п.н.

Также были использованы праймеры для *Hafnia alvei*: HafF aaggccttcgggttgtaaa и HafR agttcccgaaaggcactaag. Температура отжига 57°C, а размер ампликона 625 п.н.

Для *Klebsiella pneumoniae*: KlebF gggaccctcgggcctcatgccatcaga и KlebR tctcacagttcccgaaggcaccaa. Расчетная температура отжига 60°C, размер ампликона 843 п.н.

Для *Proteus mirabilis*: ProtF ggcggcccccctggacaaagac и ProtR tctcagcgttcccgaaggcactcct. Температура отжига 60°C, размер ампликона 315 п.н.

Для *Escherichia coli*: ColEF agctaataccgcataacgtcgcaagaccaaagg и ColER tctcacaggttcccgaaggcacattctcatct. Температура отжига 62°C, размер ампликона 571 п.н.

Для *Enterobacter cloacae*: . Температур отжига °C , размер ампликона.

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 60°C.

2.3. Амплификация участков ДНК геномов микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) формируется на умении хорошо изученных в молекулярной биологии ферментов, ДНК - полимераз, производить направленный синтез комплементарной цепи ДНК, по уже имеющейся матрице одноцепочечной ДНК, наращивая небольшую олигонуклеотидную затравку (праймер), комплементарную фрагменту этой матрицы, до размеров в несколько тысяч или даже десятков тысяч звеньев.

Каждый цикл ПЦР складывается из 3-х этапов. На первом этапе производится денатуриация ДНК, которая находится в исследуемом материале. Для этого реакционную смесь нагревают до 92 - 95°C, вследствие чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются и образуют две одноцепочечные молекулы. На втором этапе происходит отжиг (присоединение праймеров к ДНК - мишени с образованием коротких двухцепочечных участков ДНК, необходимых для инициации синтеза ДНК).

С составленными 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 и расстоянию между двумя праймерами, начинают накапливаться после третьего цикла. Синтезированные в ходе первого цикла ПЦР цепи ДНК используются в качестве матрицы для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента нуклеиновой кислоты генома вируса, бактерий

или человека. В следующих 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 применена для выявления этиологической роли различных микроорганизмов, являющимися возбудителями заболеваний определенного типа. Так, к примеру, имеются описания вариантов применения множественной ПЦР для одновременного обнаружения четырех возбудителей (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* и *A. otidis* при хроническом гнойном отите) [14].

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 1 мкл геномной ДНК (100 нг/мкл), 1 мкл 10-кратного буфера для Таq – полимеразы, поставляемого в наборе с используемым ферментом, по 1 мкл dNTP, 0,5 мкл каждого праймера и 0,5 мкл Таq – полимеразы. Во избежание испарения жидкости на поверхность каждой реакционной смеси насыпали 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 детанурации ДНК в течение 40 сек при 94°C, стадию отжига праймеров продолжительностью 1 мин 30 сек при температуре от 54 до 72°C (в зависимости от длины и нуклеотидных последовательностей использованных праймеров), и стадию элонгации в течение 1 мин 30 сек при температуре 72°C, оптимальной для Таq – полимеразы. В некоторых

случаях для оптимизации ПЦР и уменьшения количества неспецифических 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 завершения 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 50х ТАЕ 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 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 покрывал агарозу сверху тонким слоем 2 - 3 мм.

Отбирали 7 мкл раствора ДНК из эплендорфа 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 III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Испытание разработанных тест-систем для ПЦР- идентификации условно-патогенных *Enterobacteriaceae*

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 MegAlign пакета Lasergene (DNASTAR, США) и программы MegaBlast доступной через сайт <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Для определения видового состава энтеробактерий методом ПЦР были выбраны консервативные участки ДНК, кодирующие 16S РНК. Данные гены представляются наиболее удобными как для синтеза праймеров, так и для проведения полимеразной цепной реакции. 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 отличается 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 произведена попытка подбора праймеров для определения таких родов энтеробактерий как *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*,

Hafnia, Klebsiella, Morganella и Proteus. Последовательности генов 16S РНК этих энтеробактерий были вначале выравнены при помощи программы MegAlign, что позволило определить все вариабельные участки ДНК, пригодные для подбора праймеров. Данные участки нами были выделены и использованы в дальнейшем для подбора перспективных для типирования праймеров. Подбор праймеров осуществлялся с помощью программы PrimerSelect. В процессе подбора праймеров руководствовались такими рассуждениями, что температура отжига должна быть как можно выше, размер ампликона для всех пар праймеров должен различаться 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 сводится к минимуму. Самым простым способом исследования полученных ампликонов является метод агарозного гель-электрофореза, где размер ампликона должен быть более 200 п.н. При увеличении размера ампликона до 1000 п.н. и более полимераза будет расходовать слишком большое количество времени для строения цепи ДНК, что так же следует исключать при создании диагностических систем. Температуры отжига старались делать близкими по значению, что позволяет надеяться на одновременный ПЦР-анализ на разнообразные энтеробактерии в системе множественной ПЦР.

Бессспорно, из-за очень высокой консервативности последовательностей ДНК генов 16S РНК и близости между собой различных представителей энтеробактерий для некоторых из них подобрать работающие праймеры не удалось. В результате проделанной нами работы были синтезированы праймеры для амплификации *Citrobacter*: CitroF ttgtggtaataaccgcagca и CitroR acagttcccgaaaggcaccctc. Здесь расчетная температура отжига составила 580С, а размер ампликона 584 п.н. Также удалось подобрать праймеры для *Hafnia alvei*: HafF

aaggcctcgggttgtaaa и HafR agttccsgaaggcactaag. Температура отжига 570С, а размер ампликона 625 п.н. Для *Klebsiella* spp: KlebF gggacctcgggcctcatccatcaga и KlebR tctcacagttccgaaaggcaccaa. Расчетная температура отжига 600С, размер ампликона 843 п.н. Для *Proteus* spp: ProtF ggcggcccccctggacaaagac и ProtR tctcagcggtccgaaaggcactcct. Температура отжига 600С, размер ампликона 315 п.н. Для *E. coli*: ColEF agctaataccgcataaacgtcgcaagaccaaagagg и ColER tctcacgggtccgaaaggcacattctcatct. Температура отжига 620С, размер ампликона 878 п.н.

Затем были подобраны праймеры для идентификации *Morganella* spp: MmoF gccggggctgctgattatggat и MmoR cgagatggcgccgttagagttgt . Температура отжига 600С, а размер ампликона 346 п.н. *Enterobacter*. Для *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 пн (CP004009.1) и были подобраны следующие праймеры: EcoliF ACTCCTCCTGTTATCGTCTTG и EcoliR ACTGGGCTGTAGGTGGTATTATC.

При помощи программы MegaBlast было доказано, что данные праймеры способны гибридизоваться только с ДНК *E. coli*, а на ДНК других энтеробактерий гомологичных участков не обнаружено. Было предсказано, что размер ампликона должен составить 571 пн, а температура отжига – 53°С.

В качестве клинического материала были использованы образцы гноя больных, страдающими гнойно-воспалительной и раневой патологией. При исследовании практически во всех клинических образцах была обнаружена ДНК, которая определялась на агарозном гель – электрофорезе (рис. 1).

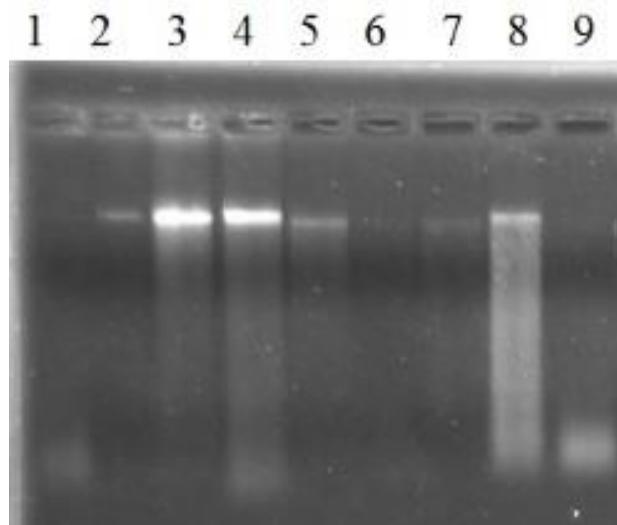


Рисунок 1. Агарозный гель - электрофорез тотальной ДНК, выделенной из клинического материала.

После подбора и синтеза праймеров было проведено определение видового состава микроорганизмов. Специфичный ампликон *E. coli* нами был выявлен в 17 случаях в образцах под номерами: 60, 978, 18, 171, 40, 62, 654, 130, 39, 61, 797, 666, 780, 696, 63, 16, 123. Электрофореграмма некоторых результатов ПЦР показана на рис. 2., рис.3. и рис. 4.

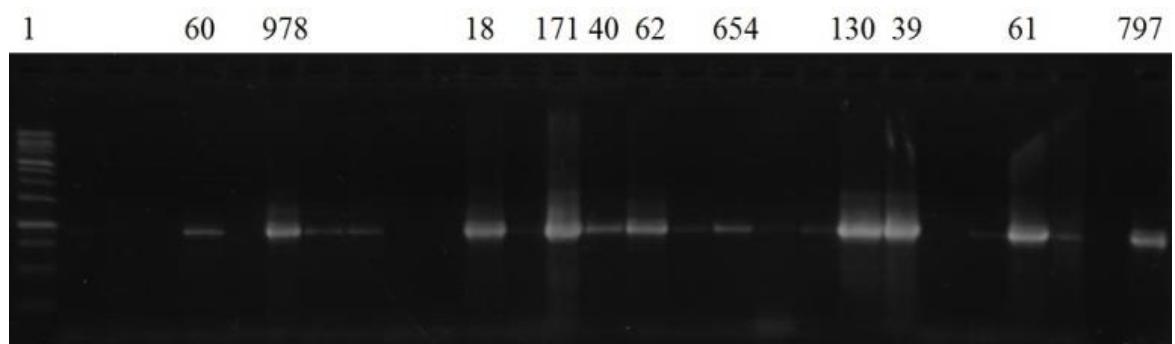


Рисунок 2. Электрофореграмма результатов ПЦР уникального участка ДНК *E. coli*. 60, 987, 18, 171, 40, 62, 654, 130, 39, 61, 797 – ампликоны размером 571 п.н.

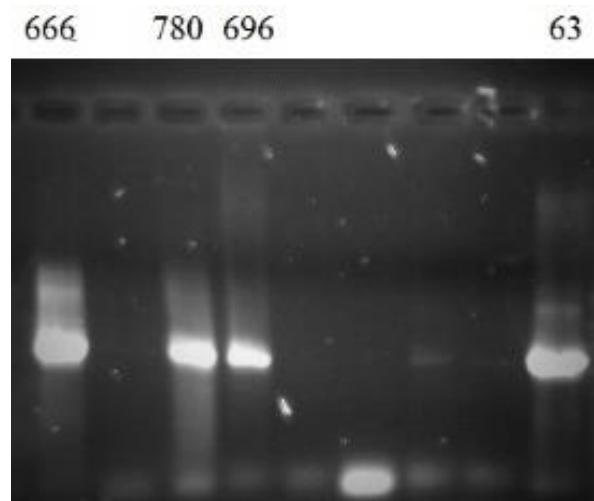


Рисунок 3. Электрофореграмма результатов ПЦР уникального участка ДНК *E. coli*. 666, 780, 696, 63 – ампликоны размером 571 п.н.

Специфичный ампликон *Enterobacter cloaceae* нами был выявлен в 14 случаях в образцах под номерами: 779, 87, 778, 742, 42, 63, 872, 696, 664, 929, 978, 62, 18, 800. Электрофореграмма некоторых результатов ПЦР показана на рис. 5. и рис. 6.

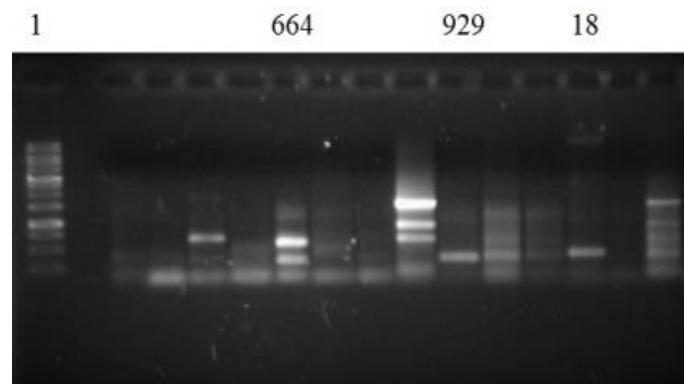


Рисунок 4. Электрофореграмма результата ПЦР участка гена 16S РНК *Enterobacter cloaceae*. 1 – маркер молекулярного веса. Размер ампликона 296 п.н. 664, 929, 18 – целевые ампликоны *E. cloaceae* размером 296 п.н.

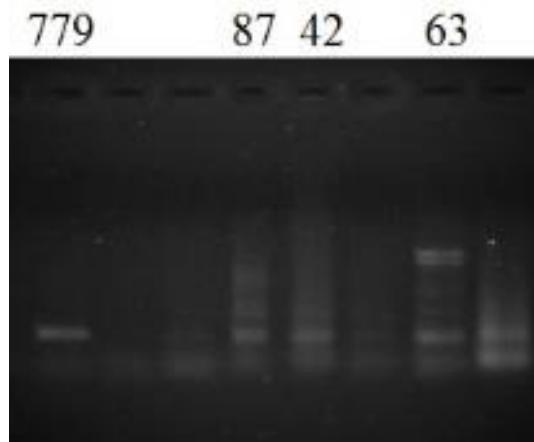


Рисунок 5. Электрофореграмма результата ПЦР участка гена 16S РНК *Enterobacter cloaceae*. 1 – маркер молекулярного веса. Размер ампликона 296 п.н. 779, 87, 42, 63 – целевые ампликоны *E.cloaceae* размером 296 п.н.

ДНК *Klebsiella pneumoniae* нами была обнаружена в 12 образцах под номерами: 121, 16, 63, 122, 123, 60, 800, 928, 119, 929, 62, 171. Электрофореграмма некоторых результатов ПЦР участка гена 16S РНК *K. pneumoniae* представлена на рис. 6. и рис. 7.

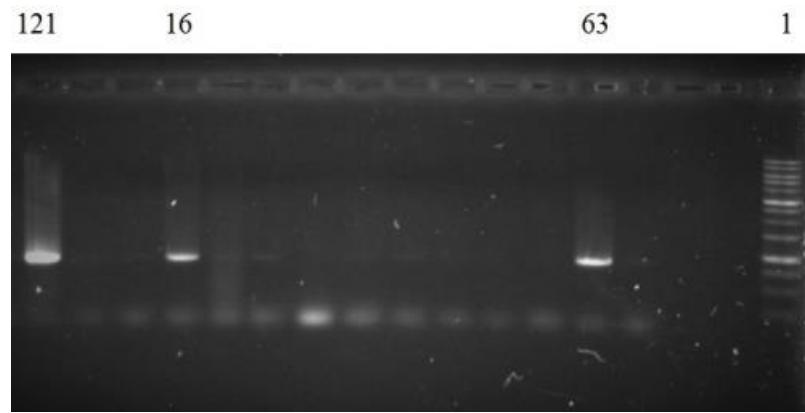


Рисунок 6 . Электрофореграмма результата ПЦР участка гена 16S РНК *Klebsiella pneumoniae*. 1 – маркер молекулярного веса. Размер ампликона 843 п.н. 121, 16, 63 – целевые ампликоны *Klebsiella pneumoniae* размером 843 п.н.

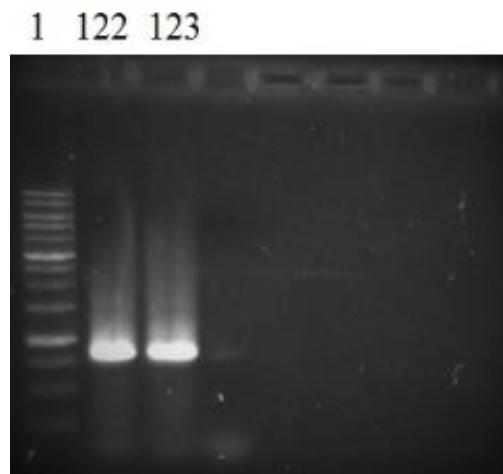


Рисунок 7. Электрофореграмма результата ПЦР участка гена 16S РНК *Klebsiella pneumoniae*. 1 – маркер молекулярного веса. Размер ампликона 843 п.н. 122, 123 – целевые ампликоны *K. pneumoniae* размером 843 п.н.

ДНК *Hafnia alvei* нами была обнаружена в 10 образцах: 121, 16, 696, 63, 798, 42, 929, 978, 668, 62. Электрофореграмма результатов ПЦР участка гена 16S РНК *Hafnia alvei* представлена на рис. 9 и рис. 10.

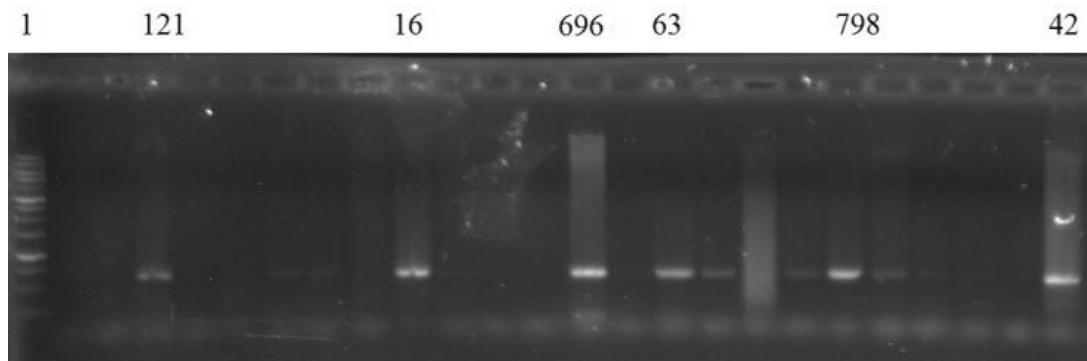


Рисунок 8 . Электрофореграмма результатов ПЦР участка гена 16S РНК *Hafnia alvei* размером 625 п.н. 1 – маркер молекулярного веса. 121, 16, 696, 63, 798, 42 – специфичный ампликон.

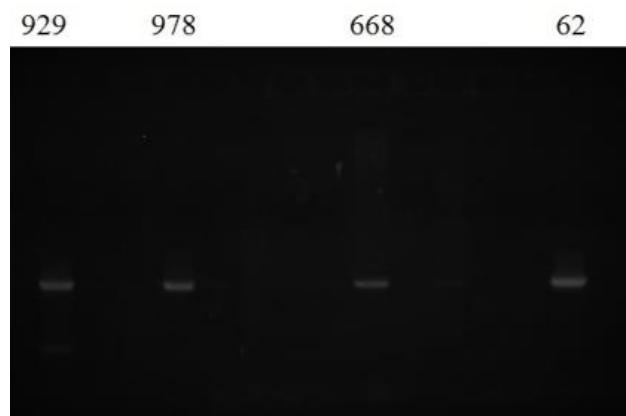


Рисунок 9. Электрофореграмма результатов ПЦР участка гена 16S РНК *Hafnia alvei* размером 625 п.н. 1 – маркер молекулярного веса. 929, 978, 668, 62 – специфичный ампликон.

Также была осуществлена амплификация участка гена 16S РНК *Proteus* spp. Этот микроорганизм был обнаружен в 6 образцах: 171, 40, 668, 16, 121, 696. Некоторые результаты амплификации представлены на рис. 10.

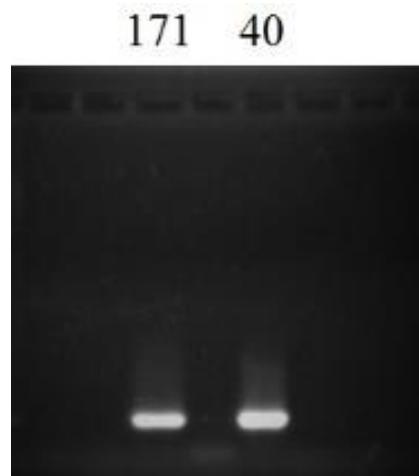


Рисунок 10 . Электрофореграмма результата ПЦР участка гена 16S РНК *Proteus* spp размером 315 п.н. 171, 40 – ампликоны *Proteus* spp.

Далее все образцы ДНК были проверены на присутствие *Morganella morganii* и проведена ПЦР при помощи праймеров MmоФ и MmоБ. *Morganella morganii* нами была выявлена в 4 образцах под номерами: 121, 41, 666, 696. Результаты амплификации представлены на рис. 5

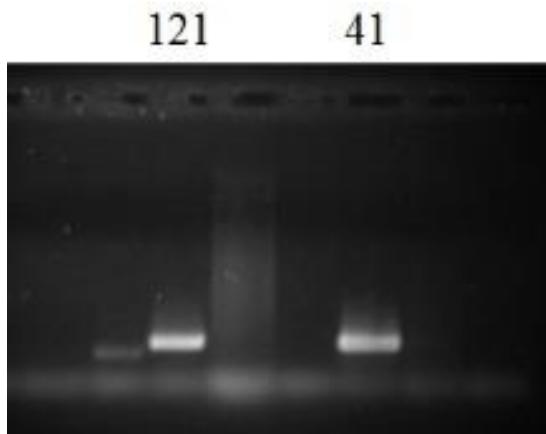


Рисунок 11. Электрофореграмма результатов амплификации участка гена 16S РНК *Morganella morganii* размером 346 п.н. 121, 41 – специфичные ампликоны *Morganella morganii*.

Из всех выделенных нами образцов ДНК, нам не удалось обнаружить *Citrobacter* spp. С каждым из этих пар праймеров мы ставили по 56 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 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 гнойно-воспалительной и раневой патологией, наиболее часто были идентифицированы *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*.

По данным исследователей при гнойно-воспалительных инфекциях и раневой патологии среди энтеробактерий преобладают представители родов *Proteus*, *Escherichia*, *Klebsiella* и *Enterobacter*, что совпадает с результатами проделанных нами исследований. Следовательно, их можно отнести к наиболее часто обнаружаемым энтеробактериям, при гнойно-воспалительной и раневой патологии. Однако в ходе проведенной работы выяснилось, что к генам 16S РНК очень сложно подобрать видоспецифичные 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 *Enterobacteriaceae* в исследуемом клиническом материале.

Объектом исследования были образцы клинического материала, выделенные от 56 больных, страдающими гнойно-воспалительной и раневой патологией. Все клинические образцы были обследованы на присутствие в них ДНК *Enterobacteriaceae*: *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloaceae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Встречаемость энтеробактерий в исследуемом клиническом материале.

№ образца	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>H. alvei</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>M. morganii</i>	<i>Citrobacter</i> sp
13	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-

16	+	-	+	+	+	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	-	-	-	-	-
39	+	-	-	-	-	-	-
40	+	-	-	-	+	-	-
41	-	-	-	-	-	+	-
42	-	+	-	+	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-
60	+	-	+	-	-	-	-
61	+	-	-	-	-	-	-
62	+	+	+	+	-	-	-
63	+	+	+	+	-	-	-
86	-	-	-	-	-	-	-
87	-	+	-	-	-	-	-
119	-	-	+	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-
121	-	-	+	+	+	+	-
122	-	-	+	-	-	-	-
123	+	-	+	-	-	-	-
124	-	-	-	-	-	-	-
130	+	-	-	-	-	-	-
169	-	-	-	-	-	-	-
171	+	-	+	-	+	-	-
180	-	-	-	-	-	-	-
181	-	-	-	-	-	-	-
310	-	-	-	-	-	-	-
632	-	-	-	-	-	-	-
653	-	-	-	-	-	-	-

654	+	-	-	-	-	-	-
662	-	-	-	-	-	-	-
663	-	-	-	-	-	-	-
664	-	+	-	-	-	-	-
666	+	-	-	-	-	+	-
668	-	-	-	+	+	-	-
692	-	-	-	-	-	-	-
696	+	+	-	+	+	+	-
742	-	+	-	-	-	-	-
778	-	+	-	-	-	-	-
779	-	+	-	-	-	-	-
780	+	-	-	-	-	-	-
790	-	-	-	-	-	-	-
797	+	-	-	-	-	-	-
798	-	-	-	+	-	-	-
799	-	-	-	-	-	-	-
800	-	+	+	-	-	-	-
868	-	-	-	-	-	-	-
870	-	-	-	-	-	-	-
872	-	+	-	-	-	-	-
928	-	-	+	-	-	-	-
929	-	+	+	+	-	-	-
977	-	-	-	-	-	-	-
978	+	+	-	+	-	-	-

В ходе проведенных исследований всех клинических образцов положительные результаты по наличию энтеробактерий были получены в 61% случаев (рис. 12).

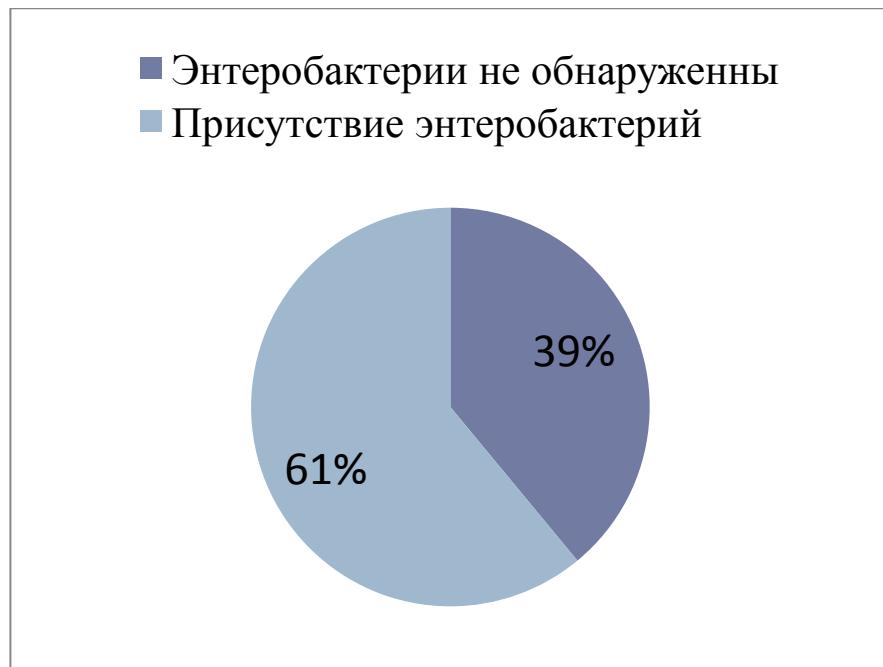


Рисунок 12. Сравнение положительных и отрицательных результатов исследований в процентном соотношении

Сравнение количества обнаружений представителей *Enterobacteriaceae* в анализируемом клиническом материале в процентном соотношении представлено на рис. 13



Рисунок 13. Сравнение количества обнаружений представителей *Enterobacteriaceae* в анализируемом клиническом материале в процентном соотношении. *E. coli* – 30% , *E. cloacae* – 25% , *K. pneumoniae* – 21% , *H. alvei* – 18% , *P. mirabilis* – 11% , *M. morganii* – 7%, *Citrobacter* sp. – 0%.

В результате анализа клинических материалов, выделенных от больных с гнойно-воспалительной или раневой патологией, наиболее часто идентифицировались *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*. Среди всех изученных клинических образцов с наибольшей частотой встречалась *E. coli*, что составляет 30 % от всех обнаруженных *Enterobacteriaceae*. *E. cloacae* составил 25 % от всех обнаруженных *Enterobacteriaceae*. *K. pneumoniae* определилась в 21 % случаев. *P. mirabilis* был идентифицирован в 11% исследованных образцов. *M. morganii*

обнаружилась в 7 % случаев. *Citrobacter* spp не был обнаружен 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.

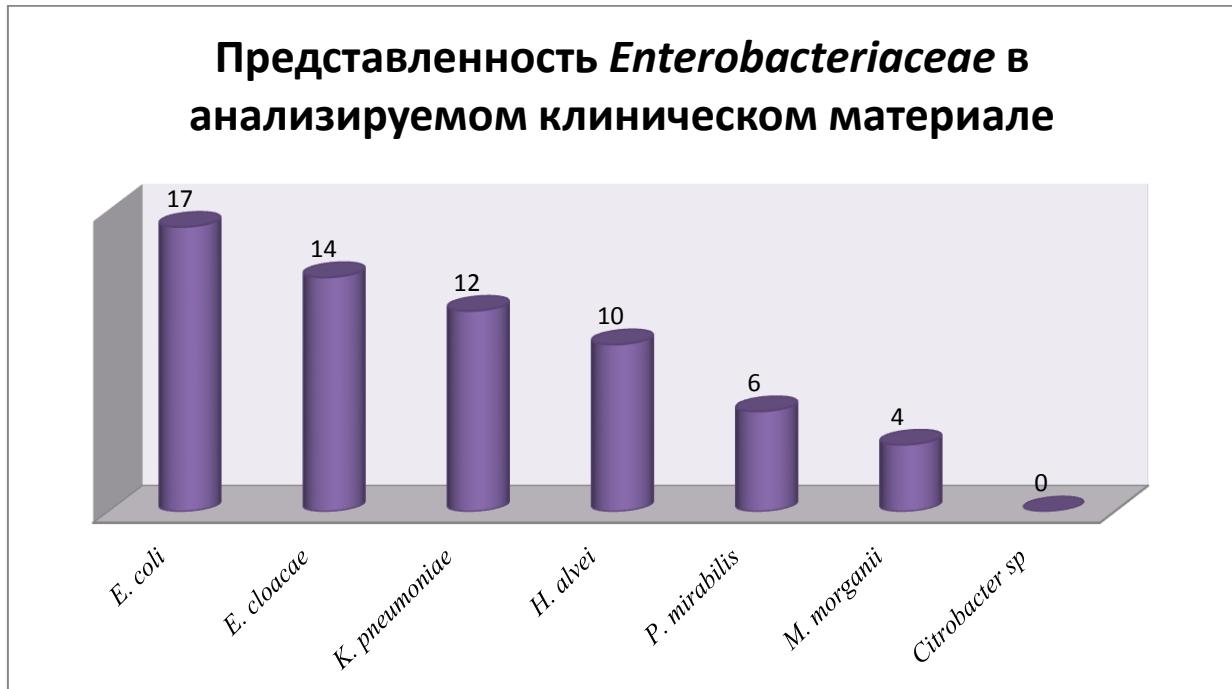


Рисунок 14. Сравнение количества обнаружений представителей *Enterobacteriaceae* в анализируемом клиническом материале.

Как видно из рисунка 13, в анализируемом нами клиническом материале, наибольшее число раз были обнаружены такие микроорганизмы, как *Escherichia coli*, *E. cloacae* и *Klebsiella pneumoniae*.

Из всех выделенных нами образцов ДНК, нам ни разу не удалось обнаружить *Citrobacter* spp. Однако следует отметить, что эти данные едва ли могут отражать полную и реальную эпидемиологическую ситуацию в регионе, так как количество исследуемых 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 56 больных, страдающими гнойно-воспалительной и раневой патологией. Далее с помощью молекулярно – генетического метода, а именно ПЦР все клинические образцы были исследованы на присутствие в них ДНК *Enterobacteriaceae*: *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*., *P. mirabilis*., *M. morganii*, *H. alvei*., *Citrobacter* spp.

В ходе выполнения данной работы, нами были подобраны олигонуклеотидные праймеры к уникальным участкам ДНК для идентификации ряда микроорганизмов, вызывающих гнойные инфекции.

В результате анализа клинических материалов наиболее часто обнаруживались *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*. По данным исследователей при гнойно-воспалительных заболеваниях наиболее часто выделяются именно эти микроорганизмы, что совпадает с результатами наших исследований. Следовательно, их можно отнести к наиболее часто выделяемым энтеробактериям, при гнойно-воспалительной и раневой патологии. [1]

ВЫВОДЫ

1. Собрана коллекция тотальной ДНК из 56 образцов клинического материала, выделенных от больных, страдающими гнойно-воспалительной и раневой патологией.

2. Подобраны и испытаны праймеры для ПЦР-идентификации представителей *Enterobacteriaceae*: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter* spp.

3. Наиболее представленными в клиническом материале больных гнойно-воспалительной и раневой патологией оказались ДНК *E. coli*, *E. cloacae* и *Klebsiella* spp.

4. Реже всего в анализируемом клиническом материале обнаруживалась ДНК *Morganella morganii* и *Proteus mirabilis*. ДНК *Citrobacter* spp. идентифицировать не удалось.

5. Испытанные на клиническом материале пары праймеров могут быть использованы при создании диагностических тест - систем для определения этиологической роли *Enterobacteriaceae* в развитии гнойных инфекций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айвазян А.В. Гемостаз при операциях на почке. // М. "Нука". 1978. С. 256.
2. Багненко С.Ф., Баткаев Э. А., Белобородов В.Б. и др. // Хирургические инфекции кожи и мягких тканей // Российские национальные рекомендации. 2009. С.9.
3. Белобородова Н.В., Байрамов И.Т. // Роль микробных сообществ или биопленок в кардиохирургии // Антибиотики и химиотерапия. № 11-12. 2008. С.44-49.
4. Борисов Л.Б. // Медицинская микробиология, вирусология, иммунология // Москва. 2005. С. 376-398.
5. Бурлаков С.В., Малышева Л.А. // Биологические свойства эшерихий, эпизоотологический процесс в Республике Адыгея // Ветеринарная патология. № 3. 2010.
6. Воробьев А.В., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А. М. Микробиология. Учебное пособие. 2003.
7. Гайн Ю. М., Демидчик Ю. Е., Шахрай С.В. Хирургические болезни: симптомы и синдромы // Том 2. 2014. С. 167.
8. Горюнов С. В., Ромашов Д. В., Бутивщенко И. А. // Гнойная хирургия // Атлас. 2-е издание. 2015г. С.9-13.
9. Горячкина Н.С., Радакова Е.Д., Гладько. Учебно-методическое пособие. Москва. 2011.
10. Гостищев В.К. // Общая хирургия // Учебник для вузов. 2001. С. 52.
11. Жилина С.В., Миронов А.Ю., Поликарпова С. В. Энтеробактерии при гнойно-воспалительных заболеваниях кожи и мягких тканей // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". 2008. №1. С. 57-58.
12. Ильнина Е. Н. Молекулярные средства измерения в современной микробиологической лаборатории // Совершенствование способов и

средств микробиологической диагностики // Клиническая лабораторная диагностика №9. 2013. С. 70.

13. Коротяев А. И., Бабичев С. А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология // Учебник для медицинских вузов. 2012.
14. Ксенофонтова Н. В., Петрова К. М., Свешникова Н. Н., Шамаева С. Х. // Спектр возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний у ожоговых больных по результатам микробиологических исследований // Сибирский медицинский журнал // № S2. том 22. 2007. С.43.
15. Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико - диагностических лабораториях. Приложение N 1 к приказу Министерства здравоохранения СССР от 22 апреля 1985 г. N 535.
16. Павлов В.Н., Казихинуров А.А, Сафиуллин Р.И. Реабилитация больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, оперированных по поводу разрывов почки с применением аллотрансплантатов // Вестник восстановительной медицины. 2007. №3. С. 27-29.
17. Петров С.В. // Общая хирургия // Учебное пособие. 1999. С. 75
18. Покровский В.И // Энтеробактерии: руководство для врачей // 1985.
19. Прозоркина Н. В., Рубашкина П. А. // Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии // Учебное пособие. 2002. С. 61-68.
20. Сасова В.А., Залесских Н.В., // Идентификация энтеробактерий и стафилококков // 2007. С.4-5.
21. Стрижакова А.Н., Давыдова А.И., Белоцерковцевой Л.Д. // Избранные лекции по акушерству и гинекологии // Руководство.2000.С 257-258.
22. Стукалов А.А., Олифирова О.С. // Хирургический сепсис. Вопросы патогенеза, клиники и интенсивной терапии // Методическое пособие для врачей общей практики. 2009.
- 23.Суфияров Р.С., Габидуллин., Тимербулатов. Лечение гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей протейно-энтеробактериальной природы / /Медицинский вестник Башкортостана.

№6. 2011. С. 95.

24. Ткачук В.Н. Закрытые повреждения почек. // Сов. мед. 1978. №10. С. 52-56.
25. Фролова А. В., Косинец А. Н., Окулич В. К. // Вестник Витебского государственного медицинского университета // Выпуск № 2, том 13, 2014. С. 62.
26. Хаджиев О.Ч., Ходырев В.Н. // Пособие по общей хирургии // Луганск, 2010. С. 16-17.
27. Чеснокова Н.П., Невважай Т.А., Морозова О.Л.. Воспаление: этиология, патогенез, патогенетическое обоснование принципов терапии // Учебное пособие. 2008. С. 2.
28. Чувилкин В.И. Разработка методов диагностики и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области. 2011. С. 1.
29. Шайхиева Г.М., Ефимов Г.Е., Мавзютов А.Р., Кулувеев Б.Р., Кайданек Т.В. Оптимизация диагностической подсистемы эпидемиологического надзора за бактериальными острыми кишечными инфекциями // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014. № 6. С. 13-18.
30. Яковлев С.В. Хирургическая инфекция // Клиническое значение резистентности микроорганизмов для выбора режима антибактериальной терапии в хирургии. 2000.
31. Andreu A., Stapleton A.E., Fennell C. et al. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* strains causing prostatitis.// J.Infect.Dis.- 1997, 176.- P.464-469.
32. Barilli F., Sanduzzi A., Ponticiella A./Epidemiology of lower respiratory tract infections/J.of Chemoth. 1995. Vol.7. №4.-P.263-276.
33. Bert F. Nosocomial and community-acquired spontaneous bacterial peritonitis:comparative microbiology and therapeutic implications/ Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2003. P. 10-15.

34. Bromiker R. Neonatal bacteria: patterns of antibiotic resistance / Infect. Control/ Hosp/ Epidemiol. 2001. P. 767-770.

35. Davis S.C., . Ricotti C, A. Cazzaniga et al. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo // Wound Repair. Regen. 2008. Vol. 16 (1). P. 23–32.

36. De Grado M., Rosenberger C.M., Gauthier A. [et al.] Enteropathogenic Escherichia coli infection induces expression of the early growth response factor by activating mitogen-activated protein kinase cascades in epithelial cells // Infect. Immun. - 2001. - Vol. 69, No. 10. - P.6217–6224.

37. Goldstein E. J. C In Vitro Activity of Moxifloxacin against 923 Anaerobes Isolated from Human Intra-Abdominal Infections / Antimicrob Agents Chemother. 2006. P. 148-155.

38. Hendolin, P.H. Use of Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Four Bacterial Species in Middle Ear Effusions / Hendolin P.H., Markkanen A., Ylikoski J., Wahlfors J.J. // J Clin Microbiol . 1997. Vol. 35, N. 8. P. 2854.

39. Jan P.,A. Mihsra., Agarawal. V. Ruptured liver abscess in a neonate / Afr. J. Paediatr Surg. 2012. P. 180-237.

40. J.J. Farmer III, B.R. Davis, F.W. Hickman-Brenner [et al.] Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens // J. Clin. Microbiol. – 1985. - Vol. 21, No. 1. - P.46-76.

41. Jeffries, C.D. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nuclear acids / C.D. Jeffries, D.F. Holtman, D.G. Gus // J. of Bacteriology. 1957. Vol. 73. № 4. P. 590–591.

42. Kordek A. Procalcitonin as a marker of perinatal infection in newborn- preliminary data / Ginecol. Pol. 2002.P/ 727-731.

43. Koulaouzidis A., Bhat S., Saeed A.A. Koulaouzidis, A. Spontaneous bacteria peritonitis / World J/ Gastroenterol. 2009. P. 1042 – 1049.

44. Mulet, X. Azithromycin in Pseudomonas aeruginosa Biofilms: Bactericidal Activity and Selection of nfxB Mutants / X. Mulet, M.D. Macia, A. Mena et al. // Antimicrob. Agents Chemother. 2009. Vol. 53 (4). P. 1552–1560.

45. Picket C.L., Whitehouse C.A. The cytolethal distending toxin family.// Trends Microbiol.- 1999, 7.- P.292-297.

46. Pieracci F. M. Management of severe sepsis of abdominal origin / Microbiology and management of abdominal infections: Dig. Diseases and Sci. № 53. 2008. P. 2585-2591.

47. 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.

48. 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.

49. Walters RC, Collins MM, L'Esperance JO. Hemostatic techniques during laparoscopic partial nephrectomy Curr Opin Urol. 2006 Sep; 16(5):327-31

50. Y. van Dijk. Management of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit using simple preventive measures // Hosp. Infect. 2002. P. 21-26.

Уважаемый пользователь!

Обращаем ваше внимание, что система Антиплагиат отвечает на вопрос, является ли тот или иной фрагмент текста заимствованным или нет. Ответ на вопрос, является ли заимствованный фрагмент именно плагиатом, а не законной цитатой, система оставляет на ваше усмотрение. Также важно отметить, что система находит источник заимствования, но не определяет, является ли он первоисточником.

Информация о документе:

Имя исходного файла: 111Сафиуллина. Диплом. Для антиплагиата..docx

Имя компании: Башкирский государственный медицинский университет

Тип документа: Прочее

Имя документа: САФИУЛЛИНА Э.И.

Дата проверки: 27.06.2016 10:07

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: выше нормы!

Оригинальные блоки: 75.9%

Заимствованные блоки: 24.1%

Заимствование из "белых" источников: 0%

Итоговая оценка оригинальности: 75.9%



Отзыв научного руководителя
о прохождении производственной практики
студентки 4 курса обучения
медицинско-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Сафиуллиной Эльвире Илдусовны по теме:
**«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ
ПРИ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ И РАНЕВОЙ ПАТОЛОГИИ»**

Сафиуллина Эльвира Илдусовна проходила производственную практику в лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН с 2015 по 2016 г. За это время она освоила основные методы молекулярной биологии: выделение ДНК, агарозный гель-электрофорез, ПЦР. Хорошо ориентируется по современным биологическим базам данных и имеет хорошую теоретическую подготовку. Проявила себя как заинтересованный специалист, к выполняемой работе подходила творчески, зарекомендовала себя с положительной стороны, нарушений правил внутреннего трудового распорядка не допускала. Замечаний к практиканту нет.

Результат дипломной практики Сафиуллиной Э.И. заслуживает положительной оценки.

Научный руководитель:
с.н.с. ИБГ УНЦ РАН

д.б.н. Кулев Б.Р.



РЕЦЕНЗИЯ

На дипломную работу студентки 4 курса очного отделения Медико-профилактического факультета с отделением микробиологии Башкирского государственного медицинского университета с отделением микробиологии

Сафиуллиной Э.И. по теме:

«Молекулярно-генетическая характеристика патогенного потенциала энтеробактерий, выделяемых при гнойно-воспалительной и раневой патологии»

Рецензируемая дипломная работа студентки 4 курса очного отделения Медико-профилактического факультета с отделением микробиологии Башкирского государственного медицинского университета Сафиуллиной Э.И. по теме: «Молекулярно-генетическая характеристика патогенного потенциала энтеробактерий, выделяемых при гнойно-воспалительной и раневой патологии».

Работа построена по традиционной схеме, включает введение, обзор литературы, описание целей, задач и методов исследований, представление собственных данных, описание результатов, их обсуждение, выводы и список цитированных источников.

Дипломная работа Сафиуллиной Э. И. удовлетворяет требованиям, предъявляемым к выпускным квалификационным работам, может быть допущена к защите и заслуживает положительной оценки.

Научный сотрудник

лаборатории молекулярных

механизмов устойчивости растений

к стрессам ИБГ УНЦ РАН, к.б.н.

Р.А. Юлдашев



РЕЦЕНЗИЯ

На дипломную работу студентки 4 курса (очная форма) медико-профилактического факультета с отделением микробиологии Башкирского государственного медицинского университета Сафиуллиной Э.И. по теме:

«Молекулярно-генетическая характеристика патогенного потенциала энтеробактерий, выделяемых при гнойно-воспалительной и раневой патологии».

Современный диапазон хирургических вмешательств создаёт опасность нагноений послеоперационных ран, которые нередко приводят к прямой угрозе жизни оперируемых. Более половины всех летальных исходов после операции связано с развитием инфекционных (гнойных) осложнений. Отмечающиеся во всех странах увеличение частоты гнойно-воспалительных заболеваний и послеоперационных осложнений, снижение эффективности их лечения объясняются также быстрым увеличением числа штаммов микроорганизмов, устойчивых к воздействию антибактериальных препаратов. В связи с этим изучение данной проблемы является актуальным.

Работа построена по традиционной схеме, включает введение, обзор литературы, описание целей, задач и методов исследований, представление собственных данных, описание результатов, их обсуждение, выводы и список цитированных источников.

Основные научные положения, выводы и практические рекомендации сформулированы исходя из решённых в ходе исследования задач. В частности подобраны видоспецифические праймеры к консервативным генам энтеробактерий для их идентификаций.

Дипломная работа Сафиуллиной Э. И. удовлетворяет требованиям, предъявляемым к выпускным квалификационным работам, может быть допущена к защите и заслуживает положительной оценки.

Зав кафедрой фундаментальной
и прикладной микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ
Минздрава России



А.Р. Мавзютов