

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

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

Файзуллина Альбина Рамилевна

**Сравнительная оценка частоты встречаемости
S.pneumoniae и *H.influenzae* при различных формах
легочной патологии человека**

Руководитель:

профессор, д.м.н.

к.м.н.

А.Р. Мавзютов

И.А. Мирсаяпова

Уфа – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень условных обозначений (сокращений).....	3
Введение	4
Глава I. Обзор литературы	
1.1.Этиология заболеваний органов дыхания.....	6
1.2.Эпидемиология заболеваний органов дыхания.....	12
1.3.Род <i>Streptococcus</i> , семейство <i>Streptococcaciae</i>	14
1.4.Род <i>Haemophilus</i> , семейство <i>Pasteurellaceae</i>	16
1.5 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	18
Глава II. Материалы и методы исследования	
2.1. Объекты исследования.....	23
2.2. Выделение ДНК.....	23
2.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	26
2.4. Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	28
Глава III. Результаты исследования и их обсуждение	
3.1.Детекция <i>Streptococcus pneumoniae</i> в клиническом материале методом ПЦР	32
3.2.Детекция <i>Haemophilus influenzae</i> в клиническом материале методом ПЦР.....	33
3.4.Статистическая обработка полученных результатов.....	35
Выводы.....	38
Список литературы	39
Приложение	48

Перечень условных обозначений (сокращений)

БП – бактериологический посев

ВБИ – внутрибольничные инфекции

ВП – внебольничная пневмония

БА – бронхиальная астма

ХБ – хронический бронхит

ОКО – отрицательный контрольный образец

ОРИТ - отделение реанимации и интенсивной терапии

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

ЭФ – электрофорез

РИФ – Реакция иммунофлюоресценции

ВДП – верхние дыхательные пути

ИНДП – инфекционные заболевания нижних дыхательных путей

ИДВП – инфекционные заболевания верхних дыхательных путей

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

Введение

Актуальность

Инфекционная патология органов дыхательной системы занимает одно из ведущих мест в структуре заболеваемости населения большинства регионов мира. Болезни органов дыхания – наиболее широко распространенная причина ухудшения здоровья у детей и взрослых, которая зависит как от организации качества медицинской помощи, так и от социальных условий жизни [Баранов А.А., 2008].

Среди неспецифических инфекций нижних дыхательных путей высокие позиции по заболеваемости, смертности, длительности периода нетрудоспособности занимают внебольничная пневмония (ВП) и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) [Чучалин А.Г., 2010; Белевский А.С., 2012].

Инфекции органов дыхания могут быть вызваны различными видами бактерий и вирусов, колонизирующими верхние и нижние дыхательные пути. Наряду с традиционными этиологическими агентами (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, вирусами гриппа) большую роль приобретают редкие и труднокультивируемые микроорганизмы, такие как *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, бактерии рода *Legionella* [Чучалин А.Г., Синопальников А.И., 2006; Вишнякова Л.А., Никитина М.А., 2005].

К наиболее распространенным возбудителям заболеваний органов дыхания относятся *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*, что и предопределило цель нашего исследования.

Цель исследования:

Оценка частоты встречаемости *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* при различных формах патологии органов дыхательной системы человека.

Задачи исследования:

1. Сбор клинического материала у больных с различными формами легочной патологии.
2. Выделение ДНК из собранного материала
3. ПЦР исследование образцов на наличие ДНК *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*.
4. Статистическая обработка полученных результатов.

Глава I. Обзор литературы.

1.1. Этиология заболеваний органов дыхания

Инфекция нижних дыхательных путей (ИНДП) – распространенная и важная группа заболеваний, с которой сталкиваются врачи во всем мире. Этиология данной группы заболеваний непосредственно связана с нормальной микрофлорой “нестерильных” отделов верхних дыхательных путей. Из множества видов микроорганизмов, колонизирующих верхние дыхательные пути, лишь некоторые, обладающие повышенной вирулентностью, способны при проникновении в респираторные отделы легких вызвать воспалительную реакцию даже при минимальных нарушениях защитных механизмов.

В составе нормальной микрофлоры слизистых оболочек верхних дыхательных путей (ВДП) здоровых детей часто обнаруживаются *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. В то же время инфекции, обусловленные *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, на сегодняшний день составляют актуальную проблему для органов здравоохранения, являясь причиной большинства случаев менингитов, внебольничных пневмоний и ряда гнойно-септических инфекций, которые часто осложняются бактериемией [А. DeRoux., et al. 2006; Чучалин А. Г., и др., 2010].

Наиболее распространенными патологиями дыхательных путей являются: пневмония, бронхиальная астма, бронхит, ХОБЛ.

Внебольничные пневмонии составляют большинство пневмоний и относятся к заболеваниям нижних отделов дыхательных путей. Пневмония – острый инфекционно-воспалительный процесс в легких [Авдеев С. Н., 2009].

Внебольничная пневмония (ВП), как и следует из названия, приобретена вне лечебного учреждения [Cassire H. A. 1998].

По официальной статистике в Российской Федерации общее число больных пневмонией ежегодно превышает 1,5 миллиона, каждый год от пневмонии погибает более 40 тысяч человек, при этом наиболее высокая

смертность регистрируется у мужчин трудоспособного возраста. В целом, пневмония занимает шестое место среди всех причин смертности и составляет 2-3%, достигая 5% в ряде регионов[LoddenkemperR., GibsonG.J., Sibilleetal.,2003;ПетроваА.И. [идр.] 2006].

Описано более 100 микроорганизмов, способных вызывать ВП. Среди бактериальных возбудителей в настоящее время лидируют *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*. Реже встречаются микоплазмы, хламидии, легионеллы, золотистый стафилококк, моракселла, грамотрицательные бактерии (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp.) и др. Есть сведения о том, что до 10-20% случаев заболевания имеют смешанную этиологию с участием атипичных возбудителей и *S. pneumoniae*, *H. influenzae*. Косвенным клиническим подтверждением этого является неэффективность терапии б-лактамами антибиотиками и эффективность макролидов, тетрациклинов, фторхинолонов[Синопальников, А.И. 2003;ArnoldF.W. et al,2007].

Данные об этиологии значительно варьируют у разных авторов в различные периоды исследований: *Streptococcus pneumoniae* (1,3 - 86,3 %), *Chlamydia pneumoniae* (2,5-8%), *Mycoplasma pneumoniae* (8-30 %), *Hemophilus influenzae* (0,1-41,2 %), *Staphylococcus* spp.(0-10,5 %), *Klebsiella pneumoniae* (0-10,3 %), *Pseudomonas aeruginosa* (0-10,5 %), грибы рода *Candida*(0-23,8 %) [Барлетт Д. Д., 2000; Манзенюк И.Н. 2001;Чучалин А.Г., и др .,2002;Казаков С.П., и др., 2004 ;Карапетян Т.А., 2008 ; Трубников Г.В., и др., 2009 ; Синопальников А.И., 2010 ; Чучалин А.Г.,Синопальников А.И., и др .,2010 ; Чубукова О.А., 2012].

Главным патогенетическим механизмом, который обуславливает развитие пневмонии, является микроаспирация бактерий, составляющих нормальную микрофлору секрета верхних дыхательных путей. При этом также имеет значение инфицирующая доза микроорганизмов или их повышенная вирулентность на фоне снижения противoinфекционной защиты нижних дыхательных путей, которую обеспечивают механические факторы, а также

механизмы неспецифического и специфического клеточного и гуморального иммунитета. При нарушении механизмов защиты легких создаются благоприятные условия для развития пневмонии

[Терентьева, В. П., 2000; Чучалин, А. Г., 2006 ; Синопальников, А. И., 2007].

Как у амбулаторных, так и у госпитализированных больных, этиология ВП представлена достаточно широким перечнем возбудителей, но многие из них отличаются по частоте у разных категорий больных [Miyashita, N., et al., 2001; Авдеев, С. Н., 2005; Sliql, W.I. , 2013].

Ведущая роль *S. pneumoniae* в этиологии заболевания, подтвержденная многочисленными исследованиями, связана с широким распространением вызываемой им инфекции, очень высоким его тропизмом к клеткам слизистой оболочки верхних дыхательных путей, наличием большого количества различных факторов патогенности, пластичностью и изменчивостью этих бактерий, что обуславливает сохранение данного микроорганизма как вида [Вишнякова А. В., 1998].

При проведении эпидемиологических или сероэпидемиологических исследований *H. influenzae*, как возбудителю уделяют значительно меньше внимания, чем грамположительным палочкам или микоплазмам, однако, данный пневмопатоген имеет важное этиологическое значение при пневмониях в пожилом возрасте, а также при развитии различных осложнений при заболеваниях органов дыхания [Прозоровский С.В., 1991; Zalacain, R. 2003; Woodhead, 2011;].

Все большее значение в развитии заболеваний респираторного тракта придается так называемым «атипичным» патогенам – *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, которые специфически взаимодействуют с эпителиальными клетками дыхательных путей, нарушая мукоцилиарный клиренс, оказывают иммуносупрессивное действие [Егоров А.М., 2000; Синопальников А.И., и др., 2001; Белоцерковская Ю.Г., 2008].

К пневмониям достаточно часто подходят не как к инфекционным заболеваниям, вызываемым широким спектром возбудителей, а как к синдромному заболеванию без этиологической расшифровки, хотя именно этиологический диагноз определяет прогноз течения болезни, рациональную антибактериальную терапию и соответствует этиологическому принципу классификации пневмоний по МКБ-10 [Барлетт Д. Д., 2000; Манзенюк И.Н. 2001; Чучалин А.Г., и др., 2002; Казаков С.П., и др., 2004; Карапетян Т.А., 2008; Трубников Г.В., и др., 2009; Синопальников А.И., 2010; Чучалин А.Г., Синопальников А.И., и др., 2010; Чубукова О.А., 2012].

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) — это болезнь легких, для которой характерно нарушение движения воздушного потока из легких. Это недостаточно диагностируемая, угрожающая жизни болезнь легких, препятствующая нормальному дыханию и полностью неизлечимая [Mogulkoc N., Karakurt S., Isalska B. et al. 1999]. ХОБЛ является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности современного общества, летальность от ХОБЛ занимает 4-е место среди всех причин смерти в общей популяции, более того, она постоянно растет [Чучалин А.Г., 2004].

Согласно прогнозам экспертов ВОЗ, к 2020 г. ХОБЛ выйдет на третье место среди всех причин летальности и на первое – среди всех причин инвалидности у взрослых [Seemungal T.A.R., Donaldson G.C., Paul E.A. et al. 1998.; Murray C.J., Lopez A.D., 1999; Sethi S. 2004; Бисенова Н.М., Митус Н.М., Тулеубаева Э.А. и др. 2011].

При бактериологическом исследовании образцов мокроты у больных, страдающих ХОБЛ, доминирующими микроорганизмами, являются *Haemophilus influenzae*, а также *Streptococcus pneumoniae* и *Moraxella catarrhalis*, удельный вес которых, по данным различных исследователей, составляет 13–46%, 7–26% и 9–20% соответственно [Sethi S., 2004].

Бронхиальная астма — хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в котором принимают участие многие клетки и медиаторы воспаления. Бронхиальная астма (БА), являясь глобальным и

быстро прогрессирующим заболеванием, которым страдают > 100 млн человек в мире, остается одной из актуальных медико-социальных проблем и привлекает к себе огромное внимание исследователей на протяжении многих 10-летий. Несмотря на разработку и внедрение новых лечебных технологий, появление высокоэффективных противоастматических лекарственных средств, смертность при БА сохраняется, что, безусловно, говорит о неадекватности проводимой терапии и присоединении инфекционных агентов.

Воспаление стенки бронхов с клеточной инфильтрацией, повреждением эпителия и увеличением его толщины, гиперплазия слизистых желез и мышечных волокон, а также расширение базальной мембраны (ремоделирование бронхов), сокращение бронхиальной мускулатуры, гипер- и дискриния. Изменения слизистой оболочки бронхов под действием различных факторов, прежде всего инфекционных, провоцирующих развитие астмы, сопровождаются неспецифической бронхиальной гиперреактивностью и склонностью к бронхоконстрикции уже при действии подпороговых раздражителей: холодный воздух, гипервентиляция, инертная пыль, выхлопные газы автомобилей, сигаретный дым.

При частых обострениях у больных БА возникает нарастающее ремоделирование дыхательных путей — расширение базальной мембраны, гиперплазия мышечных и железистых клеток, подэпителиальное образование коллагеновых волокон и десквамация эпителия, что приводит к усилению бронхиальной обструкции и уменьшению эффективности терапевтического воздействия. Таким образом, важно уменьшить количество инфицирования и реинфицирования пневмопатогенами, прежде всего *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, а также *P. aeruginosa*.

Бронхит — это заболевание, характеризующееся воспалением бронхов и проявляющееся преимущественно кашлем (сухим или с

отделением мокроты). В основе бронхита лежит воспаление слизистой оболочки бронхов. В большинстве случаев острого бронхита причиной являются инфекционные агенты: вирусы или бактерии[Таточенко В. К 2004].

Среди бактериальных возбудителей бронхита ключевое положение занимают *H.influenzae*, *S.pneumoniae* и *M.catarrhalis*. В особых клинических ситуациях (возраст старше 60 лет, сопутствующие заболевания, выраженные нарушения бронхиальной проходимости, постоянное отделение гнойной мокроты) этиологическое значение приобретают *P.aeruginosa*, *S.aureus* и некоторые энтеробактерии. Около 30% инфекционных обострений заболевания обусловлены вирусами гриппа, парагриппа, риновирусами, коронавирусами[Катосова Л.К. 1990].

Этиология инфекций нижних дыхательных путей непосредственно связана с нормальной микрофлорой верхних отделов дыхательных путей. Часто возникает инфекция смешанной этиологии, вследствие сочетания нескольких возбудителей. Из множества видов микроорганизмов, колонизирующих верхние дыхательные пути, лишь некоторые, обладающие повышенной вирулентностью, способны при проникновении в респираторные отделы легких вызвать воспалительную реакцию.

1.2.Эпидемиология заболеваний органов дыхания

Заболевания органов дыхания занимают первое место в структуре заболеваемости населения Российской Федерации [BallP.Etal, 2002;ЧучалинА.Г., соавт., 2006].

Удельный вес заболеванийорганов дыхания составляет 27,6% – у взрослых, 39,9% – у подростков и 61% – у детей[Зубков М.Н. 2009].

Число взрослых больных пневмонией в год в 5 ведущих европейских странах превышает 3 млн. случаев, в США эта цифра составляет 5 млн., причем 1,2 млн. нуждается в госпитализации, из них 60 тыс. умирает. Согласно данным официальной статистики, в России заболеваемость пневмонией взрослых в 2006-2010 гг. варьировала от 344,0 до 403,4 на 100 тыс. населения. Реальная заболеваемость пневмониями существенно выше регистрируемой, общее число больных пневмонией ежегодно составляет 1,5 млн., каждый год от пневмонии погибает более 40 тысяч человек, при этом наиболее высокая смертность регистрируется у мужчин трудоспособного возраста[Шахгильдян В.И.,2003;Чучалин А.Г., и др,2010].

Летальность от ВП составляет около 5-9%. Несмотря на невысокие цифры летальности ВП в общей популяции, у отдельных категорий больных, например у пациентов, нуждающихся в госпитализации, она достигает до 21%, 9%, у пожилых больных - 46%.

В структуре младенческой смертности регионов России заболеваемость органов дыхания стоит на третьем месте (около 7 %), из неё около 74 % приходится на пневмонии, а уровень заболеваемости органов дыхания детей 0–14 лет в последние три года составляет около 59 % [Синопальников А.И., и др.,2001; Чучалин А.Г., и др.,2002;Маркелова Н.Н., Хотько Н.И. 2013].

В последние годы внимание ученых, как в нашей стране, так и за рубежом направлено на изучение проблемы ХОБЛ, что, прежде всего, обусловлено не только существенной распространенностью этой патологии в популяции ираннейинвалидизацией и смертностью, особенно среди лиц трудоспособного возраста, но и вовлечением в процесс сердечно-сосудистой

системы и, как следствие, высоким риском развития кардиоваскулярных осложнений [Чучалин А.Г., 2003].

Поданным ВОЗ, в 2004 году от ХОБЛ пострадало 64 миллиона человек. В 2010 году общее число больных составляло уже 329 миллионов [VosT, FlaxmanAd, NaghaviM, EtAl. 2012].

Возраст и пол имеют сильное влияние на ее общую частоту и распространенность ВП, бронхита и бронхиальной астмы. Пожилые люди и мужчины больше подвержены пневмонии с длительным течением, чем женщины. Главными факторами для развития ХОБЛ являются мужской пол, табакокурение и неблагоприятные экологические условия [VosT., etal., 2012].

Несколько лет назад этому заболеванию было подвержено в основном мужское население, но с ростом табакокурения среди женщин и увеличением числа женщин на производстве, в настоящее время болезнь поражает оба пола почти равномерно [MeilanK., 2007 ; Жестков А. В., и др., 2009].

В эпидемиологических исследованиях установлено, что более 25% пациентов ежедневно обращаются к врачам в связи с заболеваниями дыхательных путей, из которых примерно 1/3 приходится на ИНДП. ВП, ХОБЛ, БА, бронхит различной степени тяжести остаются важными для практического здравоохранения и медицинской науки проблемами, группой заболеваний, наиболее часто встречающихся в клинической практике и дающих значительную инвалидизацию и высокую смертность [DrMG Pearson. Etal ., 1997 ; Биличенко Т.Н. и др., 2012].

1.3. Под *Streptococcus*, семейство *Streptococcaciae*

Род *Streptococcus* относится к семейству *Streptococcaceae*, к отделу грамположительные *Firmicutes*.

Streptococcus pneumoniae является вторым после *Haemophilus influenzae* по распространённости и важности микроорганизмом при развитии различных заболеваний органов дыхания. Патогенность пневмококка является эволюционно закрепленным признаком, степень выраженности которого определяется генетически независимыми компонентами вирулентности, способствующими преодолению специфических и неспецифических защитных механизмов; факторами проникновения и факторами, нарушающими структуру и функцию клеток, тканей и целых органов. Тяжелые формы ВП, сопровождающиеся бактериемией и приводящие к летальным исходам, достаточно часто обусловлены *S. pneumoniae* [Авдеев С. Н., Чучалин А. Г., 2001 ; Чучалин. А. Г., 2004].

Важным фактором заболеваемости пневмококковыми инфекциями считают носоглоточное носительство *S. pneumoniae*, уровень которого колеблется от 20 до 50% случаев в зависимости от сезона и организованности популяции [Белобородов В.Б., 2006; Мартынова А.В., 2008 ; Козлов Р.С., 2010].

Адгезивная активность, обусловленная взаимодействием пневмококковых поверхностных адгезинов и рецепторов эпителиальных клеток, отражает процесс колонизации и носоглоточного носительства *S. pneumoniae* [Козлов Р.С., 2010].

Фенотипы *S. pneumoniae* определяют вирулентность, патогенность, колонизацию, характер формирующегося воспалительного процесса и эффективность антимикробной терапии [Мартынова А.В., 2005].

Пневмококк распространяется воздушно-капельным путем от больных пневмонией и носителей. Медицинские работники и лица, контактирующие с больными, могут заразиться при кашле больного. Пневмококк – частая причина развития неинвазивных заболеваний, таких как: острый средний отит, синусит, трахеит, бронхит, внебольничная

пневмония с эмпиемой (или без нее) и бактериемией, а также инвазивных заболеваний: бактериальный менингит и первичная бактериемия у детей, спонтанный бактериальный перитонит, сепсис с поражением определенных органов и тканей – септический артрит, перикардит, эндокардит, миозит, остеомиелит [Marimon J.M., 2006; Страчунский Л.С., 2000]. Лабораторное исследование включает бактериологический и серологический методы, однако в последние годы все больше применяют молекулярно – генетические методы диагностики. Материалом для исследования являются мокрота, мазки со слизистой носа и зева, кровь. *S. pneumoniae* представляют собой овоидные или сферические клетки, грамположительные, в мазках они располагаются парами или короткими цепочками и под различными воздействиями могут приобретать вытянутую или ланцетовидную форму, напоминая коккобациллы [Воробьев, А.А., 2006.; Лабинская, А.С., 2010].

Серологические методы главным образом используют в случаях длительной персистенции стрептококковой инфекции, особенно если больной получал массивную антибиотикотерапию и выделить возбудителя другими методами диагностики не удастся. Наиболее часто с этой целью определяют наличие в крови стрептококкового антигена в РСК и/или специфических стрептококковых антител к токсинам, в частности к стрептолизину О. Разработаны тест-системы для ПЦР метода, которые основаны на праймерах подобранных к генам факторов патогенности: пневмолизину, аутолизину, РВР2в, *lytA*, чаще используют два первых [M.D.Smith [etal.], 2009].

Имеется много данных о том, что по основным результатам качественного определения *S.pneumoniae* в ПЦР нельзя судить о пневмококковой инфекции [M.Hassan-King et al., 2007].

Для этого необходимо количественное определение возбудителя. Для количественной ПЦР в режиме «реального времени» в основном подобраны праймеры к гену пневмолизина [O.Greiner et al., 2001].

Помимо количественной ПЦР-РВ существуют разработки мультиплексной ПЦР для определения ассоциации возбудителей пневмоний. Также с помощью мультиплексной ПЦР возможно идентифицировать до 29 серотипов *S. pneumoniae* из носоглоточного секрета [M.Antonioetal.,2009]. Возможно выявление *S. pneumoniae*, *S. aureus* и *H. influenzae* в одной пробирке с помощью мультиплексной ПЦР в бронхоальвеолярном лаваже, аспирате и плевральном выпоте [MurdochD.R. etal. 2003;RezaShariatzadeh, M. 2006.; Utine, G.E .,2008].

1.4.Род *Haemophilus*, семейство *Pasteurellaceae*

Род *Haemophilus* относится к семейству *Pasteurellaceae*, к отделу грамотрицательные бактерии *Gracillicutes*.

Частота носоглоточного носительства у взрослых варьирует в широких пределах, достигая в некоторых случаях 75%[KiehnT.E., VerhoefJ.,1999].

H.influenzae

является типичным компонентом нормальной микрофлоры носоглотки человека. При определенных условиях данный пневмопатоген становится оппортунистическим патогеном, который вызывает ИДНП и ИВДП, таких как отит среднего уха, пневмония и бронхит [FoxwellAR, KydJM, CrippsAW. 1998; ErwinAL, SmithAL, 2007;MurphyTF,etal.,2009; AgrawalA, MurphyTF., 2011].

Основные пути передачи *H. Influenzae* – воздушно-капельный и контактный. Основные факторы патогенности *H. Influenzae* – это капсула и пили, которые затрудняют поглощение бактерий фагоцитами и облегчают адгезию к слизистой оболочке верхних отделов дыхательных путей. Позднее бактерии проникают в подслизистую оболочку, вызывая воспалительную реакцию. Штаммы *H.influenzae*, обладающие высокой вирулентностью, могут

мигрировать в лимфо-и кровотоки [Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Савченко А.А., 2011].

Материалами для исследования являются мазок из носоглотки, кровь, мокрота. *H. influenzae* - представляют собой мелкие грамотрицательные сферические, овоидные или палочковидные бактерии, однако микроскопическое исследование для обнаружения данного пневмопатогена малоинформативно (чаще применяется при гнойном менингите).

Для ускоренной диагностики и дифференциации *H. influenzae* от других возбудителей пневмоний используют серологические тесты с целью обнаружения b-капсульного антигена *H.influenzae*; встречный иммуноэлектрофорез; прямую РИФ или реакцию латекс-агглютинации с анти-b-антителами. При высокой концентрации возбудителя в исследуемом материале возможна также постановка теста «набухания капсулы». Однако данные методы обладают низкой специфичностью и чувствительностью. Для выделения и идентификации патогена из материала от больных наряду с бактериологическим и серологическим исследованиями применяют ПЦР. При постановке ПЦР для выбора праймера с целью определения принадлежности возбудителя к роду *H. influenzae* используют ген бактериальной 16S рибосомальной РНК. Для качественной ПЦР подобран специфический праймер HIN (к фактору патогенности)[М.Hassan-Kingetal.,2007].

Также используется количественное ПЦР-РВ на основе определения генов факторов патогенности данного возбудителя: omp P6, rnp B, и bex A [Abdeldaim G.M. [etal.], 2009]. Разработана мультиплексная ПЦР для одновременного обнаружения *H influenzae* type b и *S. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, но они редко используются в практической медицине [Stralin, K., 2006., Utine G.E., 2008].

1.5 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Принцип метода полимеразной цепной реакции (PolymeraseChainReaction, PCR) был разработан Кэрри Мэллисом, удостоенным за это Нобелевской премии в области химии в 1993 г.

Простота исполнения, высокие показатели чувствительности и специфичности принесли методу популярность. За короткое время ПЦР - анализ распространился по всему миру, быстро выйдя из лабораторий научных институтов в сферу практического клинического использования, что позволило ему превратиться в «диагностический инструмент нового тысячелетия». На сегодняшний день ПЦР - анализ остается наиболее распространенной и динамично развивающейся технологий [Чемерис А.В. и др. 2005].

Принцип: в основе метода полимеразной цепной реакции лежит многоступенчатый циклический процесс репликации ДНК, включающий ряд последовательных стадий (этапов), составляющих трехступенчатый цикл амплификации ДНК: денатурацию (расплетение двойной спирали и расхождение нитей ДНК), отжиг праймеров и полимеризацию (элонгацию) цепей ДНК, протекающих при различных температурных режимах. Переход от одной стадии реакции к другой достигается изменением температуры в инкубируемой смеси. Данный метод обеспечивает многократное увеличение числа копий (амплификация) специфического участка ДНК, катализируемое ферментом ДНК-полимеразой в условиях *invitro*. Данный процесс происходит в пробирке в циклическом режиме контролируемого молекулярного копирования участков нуклеиновых кислот. Каждый цикл амплификации состоит из 3 этапов, протекающих при различных температурных и временных режимах [Патрушев Л.И., 2004.; Меньшиков В.В. 2009]

1 этап – нагревание амплификационной смеси до 93- 95 °С, при котором происходит термическая денатурация ДНК, в результате которой двунитевые сегменты ДНК разделяются на отдельные цепи.

2 этап - комплементарное присоединение (отжиг, гибридизация) праймеров к комплементарным последовательностям на противоположных цепях ДНК, на границах специфического участка (мишени). Отжиг протекает в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина - цитозин. Если данное условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 37-65 °С.

3 этап (элонгация)- комплементарное достраивание цепей ДНК, которое происходит от 5'- конца к 3'- концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Процесс синтеза катализируется ферментом ДНК - полимеразой и проходит при температуре 70-72 °С. Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование специфического фрагмента ДНК-ампликона, размер которого ограничен праймерами. В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей. Таким образом, в результате постановки полимеразной цепной реакции происходит экспоненциальное (в геометрической прогрессии) накопление специфических ампликонов в растворе по формуле $A = M (2^n - 1)$, где А- количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации; М- начальное количество ДНК-мишеней, а n- число циклов амплификации. Теоретически, в результате 20 циклов образуется миллион копий, в результате 30 циклов- 1 миллиард копий. Следует отметить, что во время первого цикла удлинение новой цепочки от праймера заканчивается произвольно. Однако со второго цикла в смеси начинают накапливаться специфические продукты амплификации - ампликоны, которые ограничены

по длине двумя праймерами. На самом деле эффективность каждого цикла может быть менее 100 % (до 78-97%), поэтому в действительности $P - (1+E)$, где P - количество специфических ампликонов, E - средняя эффективность цикла. Рост в геометрической прогрессии ограничен количеством реагентов, присутствием ингибиторов, образованием побочных продуктов амплификации. В зависимости от условий и количества циклов реакции амплификации, на момент достижения «эффекта плато» влияют: утилизация субстратов (дНТФ и праймеров); стабильность реагентов (дНТФ и фермента); количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы; неспецифические продукты или праймер-димеры, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу; концентрация специфического продукта и неполная денатурация при высокой концентрации продуктов амплификации. Чем меньше начальная концентрация ДНК - мишени, тем выше риск выхода реакции на плато. Этот момент может нас тупить до того, как количество специфических продуктов амплификации будет достаточно, чтобы их можно было проанализировать. Избежать этого позволяют оптимизация условий протекания реакции амплификации. Описанный выше механизм стандартной полимеразной цепной реакции, разработанной Мюллісом, как правило, дает хорошие результаты при амплификации коротких нуклеотидных последовательностей (не более 3 т.п.н.) [Васильев Д.А, Щербаков А.А., Карпунина Л.В., Золотухин С.Н.2004.;Онищенко Г.Г. 2004 г.].

Преимущества метода ПЦР

1. Прямое определение наличия возбудителей. Выявление специфического участка ДНК возбудителя методом ПЦР дает прямое указание на присутствие возбудителя инфекции в клиническом материале.
2. Высокая специфичность метода ПЦР обусловлена тем, что уникальность подобранной нуклеотидной последовательности праймеров исключает возможность получения ложных результатов, в

отличие от иммунологических методов анализа, где возможны ошибки в связи с наличием перекрестно-реагирующих антигенов.

3. Высокая чувствительность метода ПЦР позволяет выявлять даже минимальные количества нуклеиновых кислот вирусов или бактерий в материале, в том числе наличие возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний при отрицательном ответе бактериологического, иммунологического, микроскопического методов. Чувствительность ПЦР анализа составляет 10-100 клеток в пробе, а в иммунологических и микроскопических тестах она достигает 10^3 - 10^5 клеток.

4. Универсальность процедуры выявления различных возбудителей. Материалом для исследования в методе ПЦР служит выделенная из клинического образца ДНК или РНК возбудителя. Метод основан на выявлении фрагментов ДНК или РНК, являющихся специфичным для конкретного микроорганизма. Универсальность генетического кода всех НК позволяет применять унифицированные методы проведения лабораторных исследований, что дает возможность диагностировать несколько возбудителей в одной биопrobe. В качестве исследуемого материала могут использоваться различные биологические выделения (мокрота, слизь), соскобы эпителиальных клеток, кровь, сыворотка [Херрингтон С. 1999].

5. Получения результата анализа высокой скоростью. Для проведения ПЦР - анализа не требуется выделение и выращивание культуры возбудителя, что в основном занимает большое количество времени. Унифицированный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции и автоматизация процесса амплификации дает вероятность провести полный анализ за 4-5 часов, а ПЦР в режиме реального времени сокращает время исследования до 1,5-2 часов.

6. Вероятность диагностики не только острых, но и латентных инфекций. В особенности эффективен метод ПЦР для диагностики труднокультивируемых, некультивируемых и персистирующих форм

микроорганизмов, с которыми нередко приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях.

7. Вероятность дифференциальной видовой диагностики [Синопальников А.И., 2003].

Недостатки метода ПЦР

1. Возможность реакции кросс - контаминации. Подбор праймеров происходит на основе имеющихся знаний о геноме диагностируемого и сходных с ним микроорганизмов. Теоретически существует вероятность наличия такого же фрагмента и у других микроорганизмов, геном которых в настоящее время не расшифрован, и которые не были протестированы на возможность перекрестной реакции. Наличие в проверке таких микроорганизмов может привести к ложноположительному результату анализа.

2. Невозможность отличить живые организмы от неживых без дополнительной стадии (обратной транскрипции), поскольку амплифицируется ДНК, как живого, так и погибшего микроорганизмов. Для этого необходимы определенные требования, учитываемые при использовании ПЦР для контроля эффективности лечения. В общем случае подобный контроль должен проводиться через определенный промежуток времени, в течение которого происходит полная элиминация возбудителя. Обычно этот интервал составляет 4-8 недель [Васильев Д.А, Щербаков А.А., Карпунина Л.В., Золотухин С.Н., 2004].

Глава II. Материалы и методы исследования

2.1 Объекты исследования

Объекты исследования - 200 пациентов в возрасте 18-75 лет находящихся на стационарном лечении в пульмонологических отделениях больниц г.Уфы в период с сентября 2015 по февраль 2016г.с различными диагнозами патологий органов дыхания, а именно: внебольничная пневмония, бронхиальная астма, бронхит, ХОБЛ различной степени тяжести.

Материал для исследования - утренняя мокрота, выделяющаяся у больных во время приступа кашля. Взятие биоматериала осуществлялось до начала приема антибактериальных препаратов и местных манипуляций с соблюдением правил асептики и антисептики в профильных отделениях стационаров[Онищенко Г.Г., 2005]. Практическая часть эксперимента была выполнена на базе Башкирского Государственного Медицинского университета (кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии).

2.2 Выделение ДНК

Для разжижения мокроты исследуемые образцы обрабатывали реагентом для предобработки слизистого материала «Муколизин» («ИнтерЛабСервис», Россия)

Для выделения ДНК из клинического материала использовали коммерческий набор АмплиПрайм«ДНК-сорб-АМ» («ИнтерЛабСервис», Россия)

Состав набора «ДНК-сорб-АМ»:

- Лизирующий раствор (30 мл, 1 флакон);
- Отмывочный раствор (100 мл, 1 флакон);
- Сорбент универсальный (1,0 мл, 2 пробирки);
- ТЕ-буфер для элюции ДНК (5,0 мл, 2 пробирки);
- ВКО комплексный (1,0 мл, 1 пробирка);

- ВКО-FL (1,0 мл, 1 пробирка);
- ОКО (1,0 мл, 1 пробирка).

Метод выделения с сорбентом заключается в следующем: клинический образец обрабатывается лизирующим раствором в присутствии частиц силики - сорбента. В результате происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК в присутствии лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и последующей отмывкой. При добавлении раствора для элюции ДНК к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности силики в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР - исследования.

Подготовка к проведению процедуры выделения ДНК:

1. Включить термостат и установить температуру 65 °С.
2. Лизирующий раствор (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) следует прогреть, перемешивая при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
3. Подготовить и расставить в штативе необходимое количество одноразовых стерильных полипропиленовых пробирок объемом 1,5 мл и промаркировать их.
4. Подготовить и расставить в штативе пробирки с клиническими образцами. Перед проведением процедуры экстракции нуклеиновых кислот осадить капли материала со стенок пробирки и внутренней чашки крышки центрифугированием (1500-3000 об/мин в течение 5 секунд), после чего аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе, избегая разбрызгивания и попадания материала на внутреннюю часть крышки.

Процедура выделения ДНК.

1. В подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки внести по 10 мкл ВКО-комплексного (внутренний контрольный образец для проведения ПЦР с электрофоретической детекцией).
2. Ресуспендировать сорбент и внести в каждую пробирку по 20 мкл сорбента универсального, после чего по 300 мкл лизирующего раствора, используя наконечники с аэрозольным барьером.
3. Внести по 100 мкл мокроты, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром. В пробирку отрицательного контроля внести 100 мкл ОКО (отрицательный контрольный образец).
4. Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе и инкубировать 5 мин при 65°C в термостате. После окончания инкубации содержимое повторно перемешать на вортексе и оставить при комнатной температуре на 2 мин.
5. Осадить сорбент в пробирках центрифугированием при 10 тыс об/мин в течение 30 сек. Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без фильтра.
6. Добавить в пробы по 1 мл отмывочного раствора, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.
7. Повторить п.5.
8. Поместить пробирки в термостат с температурой 65°C на 5-10 мин для подсушивания сорбента, при этом крышки пробирок должны быть открыты.
9. В пробирки добавить по 100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК, используя наконечник с фильтром. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Поместить в термостат с температурой 65°C на 5 мин.

10. Центрифугировать пробирки при 12 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге.

2.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для достижения поставленных в нашем исследовании целей, использовали ранее подобранные ранее праймеры к специфическим консервативным последовательностям ДНК микроорганизмов *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*- генам 16SpPНК, депонированным в международной базе нуклеотидных последовательностей EMBL/GenBank, свойственных только для данных микроорганизмов, последовательностей ДНК.

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймеров	Темп. Отжига	Ожидаемый размер продукта (пн)
STPPF/ STPPR	Fgcataagagtagatgttgcacatttg Rcgtagttagccgtccctttctg	65°C	290
HEM-1F/ HEM-1R	F aagggcacgcaggcggtattta R gtttagctacgggcgccagagtta	60°C	292

При оценке результатов амплификации ПЦР с ранее подобранными праймерами положительными считались пробы (то есть содержащими ДНК микроорганизма), в которых размер продукта, выявленный в геле, соответствовал положительному контрольному образцу (чистая культура микроорганизма), а у отрицательного контрольного образца после проведения ПЦР продукт амплификации не определялся.

Реакционная смесь на одну пробирку:

12,5мкл mQ

2,5мкл dNTP

2,5мкл Taq Буфер

1мкл праймераforward

1мкл праймерareverse

0,5мкл Taq-полимеразы

1. В подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки вносим по 20мкл реакционной смеси

2. Во избежание испарения жидкости на поверхность каждой реакционной смеси наливаем 50 мкл вазелинового масла.

3. «Прокалывая» слой масла вносим в каждую пробирку по 5 мкл выделенной бактериальной ДНК.

4. Проводим амплификацию на термоциклере «Терцик МС-2» (ДНК-технология, Россия).

Для проведения ПЦР были использованы: термостат программируемый четырехканальный ТП-4- ПЦ-01 «Терцик».

Программа амплификации:

- | | |
|------------------------------|------------|
| 1. Денатурация – 95°C – 20 с | } 33 цикла |
| 2. Отжиг – X – 20 с | |
| 3. Элонгация – 72°C – 30 с | |
| 4. Хранение – 16°C – 10 с., | |

где X – температура отжига праймера (для каждого своя)[Онищенко Г.Г. 2004 г.].

2.4 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез в геле – это метод, который служит для разделения макромолекул на основе их размера, электрического заряда и других физических свойств. Движущей силой электрофореза является напряжение, прикладываемое к электродам на каждом конце геля. Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом, используемым для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. Эта методика проста, быстро осуществляется, и способна разделять фрагменты ДНК, которые не могут быть разделены надлежащим образом с помощью других процедур. Более того, локализация ДНК в геле может быть определена путем окрашивания бромистым этидием, - флуоресцентным интеркалярным красителем, в низких концентрациях.

В процессе электрофореза макромолекулы вынуждены перемещаться через поры, и скорость их перемещения через электрическое поле зависит от следующих параметров:

- сила электрического поля
- размер и форма молекул
- относительная гидрофобность образцов
- ионная сила и температура буфера, в котором движутся молекулы

Компоненты электрофореза в агарозном геле.

Агароза. Агароза, природный коллоид, который выделяют из морских водорослей, является линейным полисахаридом, образованным повторяющимся элементом – агаробиозой. Агароза очень хрупка, и легко разрушается при манипулировании. Агарозные гели получают суспендированием сухого порошка агарозы в водном буфере, и кипячением смеси до того момента, когда агароза расплавится и образует прозрачный раствор. Затем раствор наливают на подложку и дают остыть до комнатной температуры, чтобы сформировался прочный гель. При застывании агароза формирует матрикс, плотность которого определяется концентрацией.

Буфер для электрофореза. На электрофоретическую подвижность ДНК воздействуют состав и ионная сила буфера для электрофореза. В отсутствие ионов, электропроводность минимальна, и перемещение ДНК происходит медленно, если вообще происходит. В буфере с высокой ионной силой электропроводность очень эффективна, и образуется значительное количество тепла. Существует несколько буферов для электрофореза нативной двухцепочечной ДНК. Они содержат EDTA и Tris – ацетат (TAE), Tris – борат (TBE), или Tris – фосфат (TPE).

Концентрация агарозы. Фрагмент ДНК заданного размера перемещается в геле на различные расстояния в зависимости от концентрации агарозы. При соответствующих концентрациях агарозы и/или буфера возможно разделить сегменты ДНК, содержащие от 20 до 50000 п.н.. В горизонтальных гелях агароза обычно используется в концентрации от 0,7% до 3%.

Маркерная ДНК. При заданном напряжении, концентрации агарозного геля и буфера, расстояние перемещения зависит от молекулярного веса исходного материала. Поэтому, маркерная ДНК известного размера должна наноситься на дорожки и с левого, и с правого края геля. Маркер обычно содержит определенный набор известных сегментов ДНК, которые облегчают определение размера исследуемой ДНК.

Буфер для нанесения. Образцы ДНК, которые будут наноситься на агарозный гель, сначала смешивают с буфером для нанесения, обычно содержащим воду, сахарозу и краситель. Буфер для нанесения используется для 3х целях:

- увеличение плотности образца для обеспечения попадания ДНК в лунку
- добавления красителя к образцу, чтобы облегчить процесс нанесения
- добавление к образцу такого красителя, который в электрическом поле будет двигаться в сторону анода на предсказуемое расстояние.

Процедура электрофореза.

Взвешивали 1,7 г сухой агарозы, добавляли 2 мл ТАЕ буфера в колбу и заливали 100 мл дистиллированной водой. Нагревали в микроволновой печи до расплавления агарозы (2-3 мин.), периодически перемешивая смесь, доводили до кипения. Затем охлаждали смесь до 50 – 60°C.

После того как смесь остывала, разливали агарозу в специальную форму с двумя гребенками и давали гелю застыть. Толщина геля при этом должна быть не менее 2 мм, но не более 5 мм.

После того как гель полностью сформировался, аккуратно удаляли гребенки и помещали гель в электрофоретическую камеру.

Приготовление ТАЕ-буфера:

1 л 5х-ного ТАЕ буфера готовили путем разбавления 50х-ного ТАЕ буфера в дистиллированной воде. К 100 мл 50х-ного ТАЕ буфера добавляли 900 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешивали.

Добавляли достаточное количество ТАЕ буфера в прибор для электрофореза, чтобы гель был покрыт слоем буфера около 2 - 10 мм.

В каждую пробирку добавляли по 3 мкл красителя (бромфеноловый синий), откручивали на вортексе, чтобы краситель попал под масляную смесь. Наносили 10 мкл каждого образца в последовательно расположенные лунки, а соответствующие ДНК маркеры в первую и последнюю лунки по 9 мкл.

Подключали клеммы прибора к источнику питания, так чтобы (-) находился на старте, а (+) - на финише.

Запускали электрофорез при помощи источника питания (Эльф – 4, ДНК – Технология) при заданных параметрах: сила тока 400 мА, мощность 80 Вт, напряжение 120 В. На старте пузырей должно быть больше, чем на финише.

Электрофорез проводили 20 минут, затем вынимали гель из камеры и перекладывали в кювету для окрашивания. Заливали раствором бромистого этидия и окрашивали в течение 10 минут.

Сливали бромистый этидий в колбу, гель промывали проточной водой. Помещали на стекло УФ – трансиллюминатора «УВТ-1» («Биоком») для визуализации. Включали прибор и анализировали результаты исследования при освещении ультрафиолетом с фильтром (304 нм). Документирование результатов проводили с использованием цифровой видеокамеры «Mintron» и программы Biotest-D» («Биоком», Россия).

Глава III. Результаты исследования и их обсуждение

3.1. Детекция *Streptococcus pneumoniae* в клиническом материале методом ПЦР

По результатам проведенного ПЦР-анализа, было выявлено наличие ДНК *Streptococcus pneumoniae* в 126 образцах из 200.

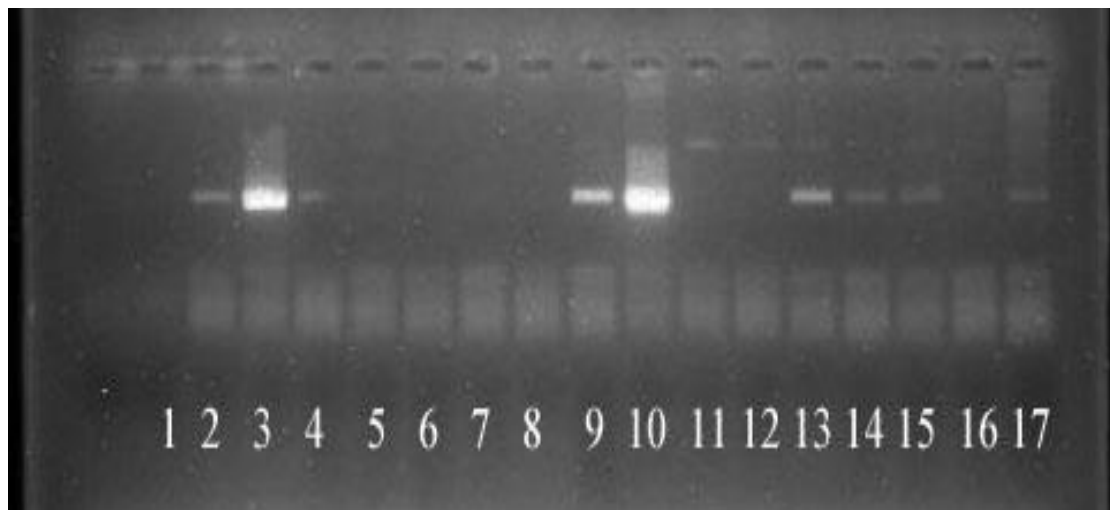


Рисунок 1. Электрофореграмма результатов амплификации ДНК чистой культуры *S. pneumoniae* размером 290пн и ДНК исследуемых образцов:

- 1 - отрицательный контроль;
- 2 – ДНК чистой культуры *S. pneumoniae*;
- 3 – 17 ДНК исследуемых образцов.

Положительными считались пробы, в которых размер продукта соответствовал 290п.н. Напротив, у отрицательного контрольного образца после проведения ПЦР продукт амплификации не определялся.

Частота встречаемости *S.pneumoniae* при различных диагнозах (таб.2):

бронхиальная астма – 80,5%

бронхит – 73,7%

пневмония – 62,3%

ХОБЛ – 42,7%

Таблица 2. Результаты ПЦР-анализа образцов на обнаружение ДНК *S.pneumoniae*

	кол-во образцов	обнаруж	не обнаруж
пневмония	61	38	23
БА	36	29	7
ХОБЛ	65	31	34
Бронхит	38	28	10
Всего	200	126	74

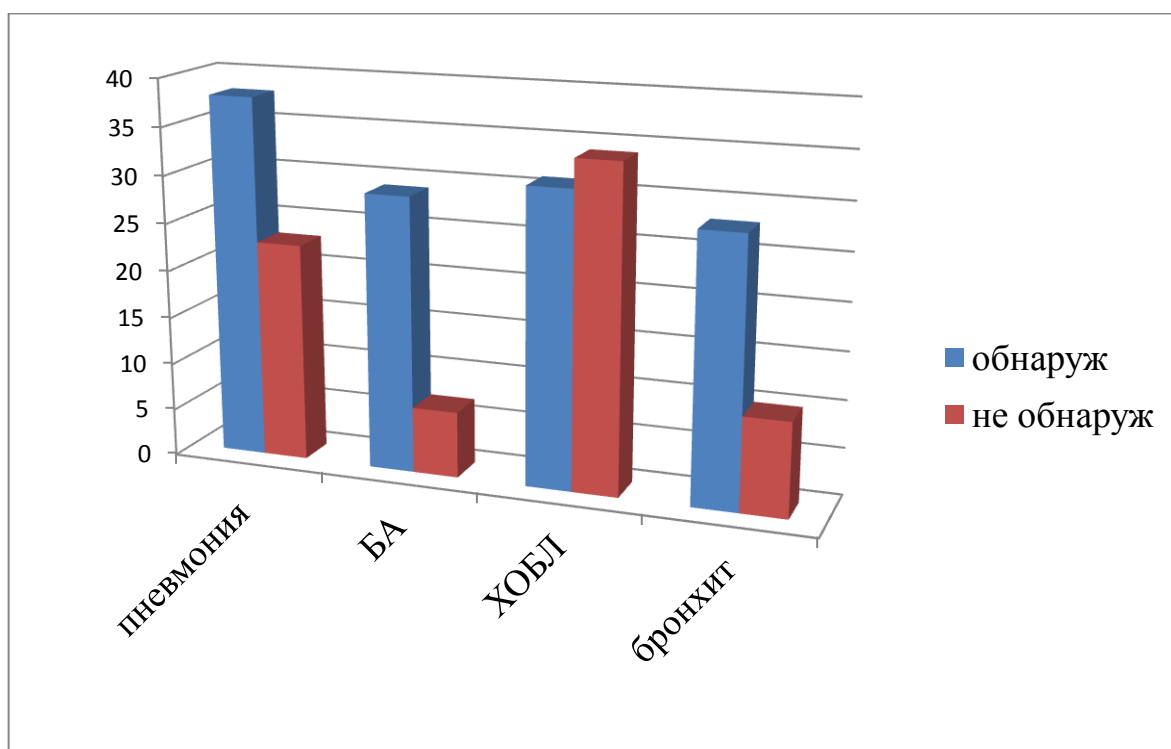


Рисунок 2: Частота встречаемости *S.pneumoniae*.

3.2 Детекция *Haemophilus influenzae* в клиническом материале методом ПЦР

По результатам, проведенного ПЦР-анализа, было выявлено наличие ДНК *H. influenzae* в 79 образцах из 200. На полученных электрофореграммах положительными считались пробы, в которых размер продукта соответствовал 292п.н. Напротив, у отрицательного контрольного образца после проведения ПЦР продукт амплификации не определялся.

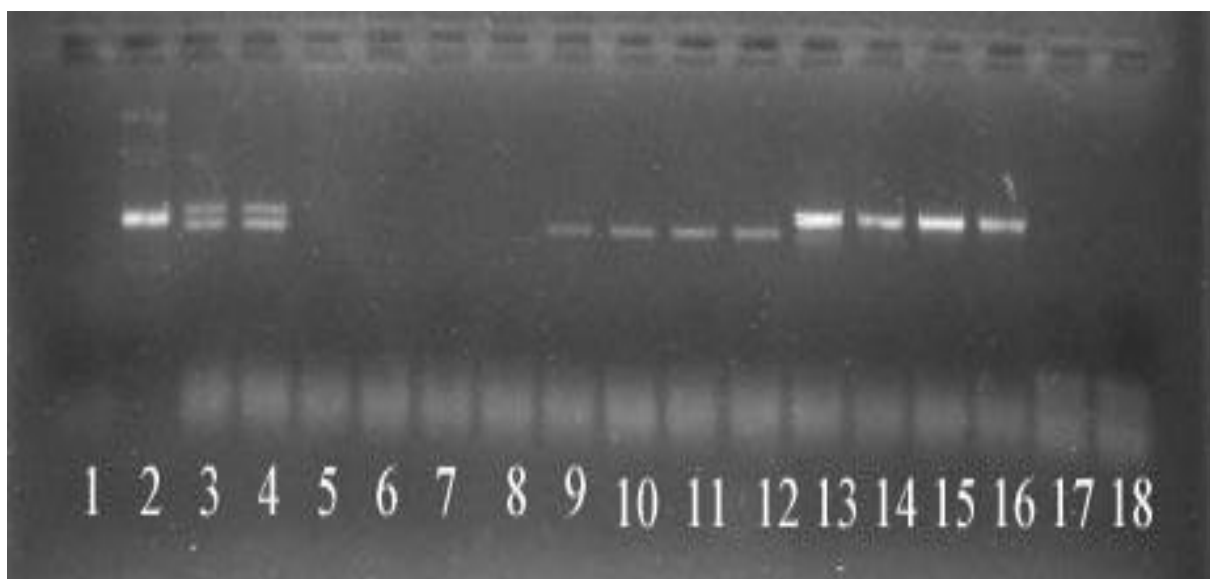


Рисунок.3. Электрофореграмма результатов амплификации ДНК чистой культуры *H. influenzae* размером 292пн и ДНК исследуемых образцов.

- 1 - отрицательный контроль;
- 2 – ДНК чистой культуры *H. influenzae*;
- 3 - 18 ДНК исследуемых образцов.

Частота встречаемости *H. influenzae* при различных диагнозах (таб.3):

бронхиальная астма –55,5%

бронхит – 60,5%

пневмония – 27,9%

ХОБЛ –29,2%

Таблица 3. Результаты ПЦР-анализа образцов на обнаружение ДНК *H. influenzae*.

	кол-во образцов	обнаруж	не обнаруж
пневмония	61	17	44
БА	36	20	16
ХОБЛ	65	19	46
Бронхит	38	23	15
Всего	200	79	121

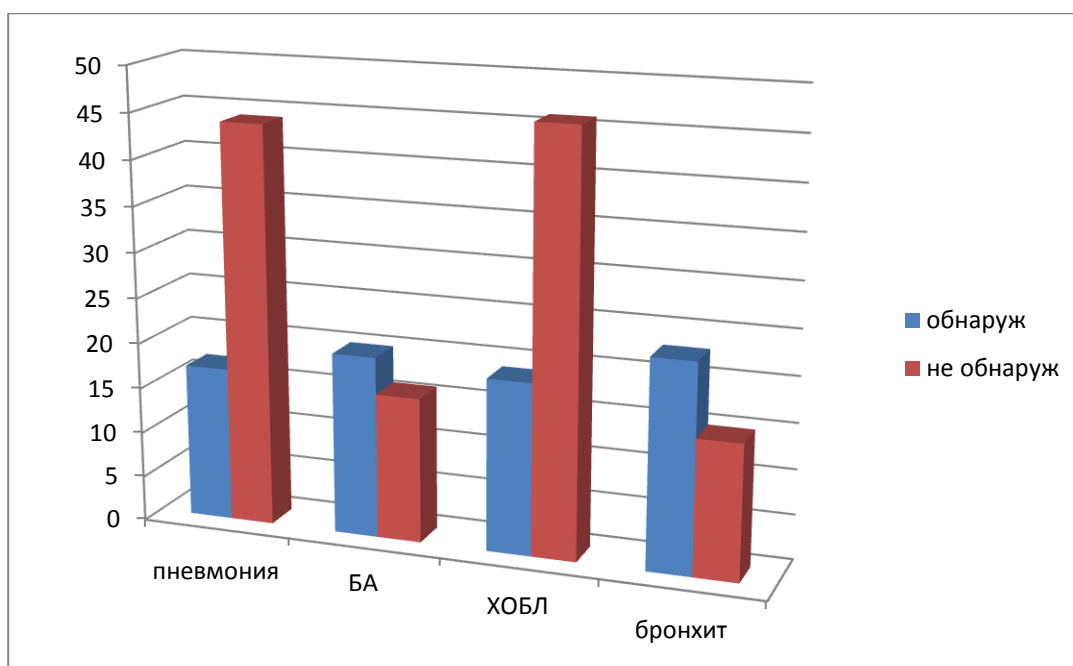


Рисунок 4: Частота встречаемости *H. influenzae*.

3.3. Статистическая обработка полученных результатов

Статистические расчеты проводились при помощи программы для работы с электронными таблицами Microsoft Excel корпорации Microsoft и при помощи программы AtteStat, предназначенной для профессиональной статистической обработки данных. AtteStat выполнен в виде надстройки к электронным таблицам Microsoft Excel. Программа полностью интегрирована в интерфейс электронных таблиц, не требует никаких настроек и не конфликтует с другими программами. Для проверки статистической значимости различий частоты встречаемости использовался непараметрический метод статистического анализа-Критерий χ^2 Пирсона. Критерий хи-квадрат позволяет оценить значимость различий между фактическим количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы. Результат считали статистически значимым при $p < 0,05$, с учетом поправки Йейтса на непрерывность [Реброва О. Ю. 2002.; Банержи А., 2007.]

В последующем проводили сравнительный анализ полученных данных посредством программы AtteStat критерия χ^2 (таб.4).

Таблица 4. Расчет критерия χ^2 .

	χ^2	p
Пневмония	13,2	p<0,01
БА	4,089	p<0,05
ХОБЛ	0,297	p>0,05
Бронхит	0,954	p>0,05

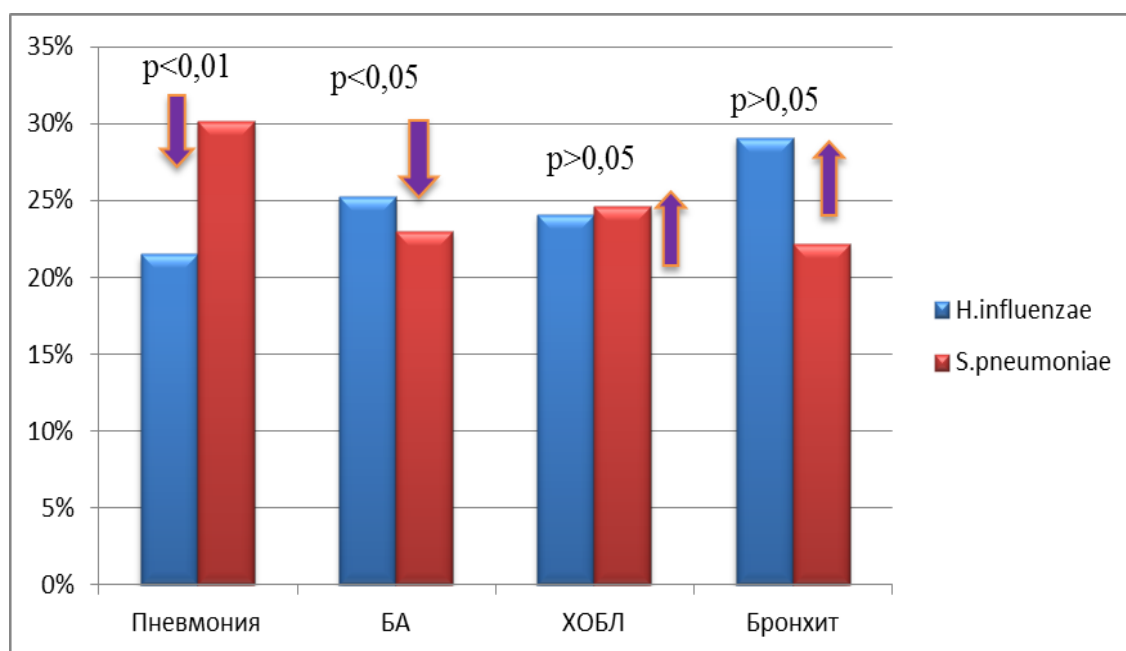


Рисунок 5. Сравнение встречаемости *S.pneumoniae* и *H. influenzae* с учетом критерия χ^2 .

При сравнительном анализе полученных данных, было выявлено, что статистически значимые различия были обнаружены при ВП и БА. При ХОБЛ и бронхите значения $p>0,05$, что говорит о статистической не значимых результатов по частоте

встречаемости пневмопатогенов.

Следует отметить, что *H. Influenzae* чаще были детектированы у пациентов при средней и тяжелой степени тяжести заболеваний органов дыхания. Таким образом, учитывая высокий процент обнаружения *S.pneumoniae* и *H.influenzae*, необходимо раннее определение данных пневмопатогенов для своевременного назначения этиотропной терапии.

ВЫВОДЫ

1. По данным ПЦР – анализа при исследовании мокроты, взятой у 200 больных пульмонологических отделений клинических больниц г. Уфы в зимнее-весенний период 2015-2016 года с различной патологией органов дыхания было выявлено

-ДНК *Streptococcus pneumoniae* в 126 образцах из них: с диагнозом ВП в 30,2%, БА – 23%, ХОБЛ-24,6%, бронхит – 22,2% случаев.

-ДНК *Haemophilus influenzae* в 79 образцах из них: с диагнозом ВП в 21,5%, БА – 25,3%, ХОБЛ-24,1%, бронхит – 29,1% случаев.

2. Расчет достоверности различий частоты обнаружения видоспецифических фрагментов ДНК (ген 16SpPНК) *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* при различных формах патологии органов дыхательной системы показал, что при ПЦР исследовании фрагменты ДНК *Streptococcus pneumoniae* достоверно чаще обнаруживались в образцах пациентов с диагнозами «внебольничная пневмония», и «бронхиальная астма», чем фрагменты ДНК *Haemophilu sinfluenzae*.

3. В мокроте больных, где была детектирована ДНК *Haemophilus influenzae* заболевание характеризовалось более тяжелым клиническим течением.

Список литературы

1. Авдеев, С. Н. Тяжелая внебольничная пневмония // Российский медицинский журнал. - 2005. - Т. 13, № 5. – С. 33 – 48.
2. Авдеев С. Н., Чучалин А. Г. Тяжелая внебольничная пневмония // Там же. 2001. Т. 9. № 5. С. 177–181
3. Авдеев С.Н. Аспирационная пневмония: современные подходы к диагностике и терапии / С.Н. Авдеев // Пульмонология. – 2009. - № 2. – С. 10-16.
4. Белоцерковская Ю.Г. Роль *Chlamydophila pneumoniae* в бронхолегочной патологии человека /Ю.Г. Белоцерковская, А.И. Синопальников //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. -2008. –Т. 10. -№1. –С.15-24.
5. Банержи А. Медицинская статистика понятным языком: вводный курс. – М.: Практическая медицина, 2007.
6. Белобородов В.Б. Антибактериальная терапия инвазивной пневмококковой инфекции и проблема резистентности пневмококков // Инф. и антимикр. терапия. 2006. №6. С.168-172.
7. Белевский А.С. , Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (пересмотр 2011г.). //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия,2010. Т. 12, № 3. //М.:Российское респираторноеобщество, 2012. 80 с.
8. Бисенова Н.М., Митус Н.М., Тулеубаева Э.А. и др. Мониторинг бактериального спектра мокроты больных с пневмонией и обострением ХОБЛ// Лабораторная диагностика. – 2011. - №1. – С.56-58
9. Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Мавзютов А.Р. Филогенетическая систематика прокариот: Методические рекомендации для студентов, обучающихся по специальности Микробиология. – Уфа. 2011. 19 с.
10. Барлетт .Д. Д. Инфекции дыхательных путей. М.: Бином. - 2000. –

192с.

11. Васильев Д.А, Щербаков А.А., Карпунина Л.В., Золотухин С.Н. Учебно-методическое пособие по методам частной бактериологии.-2004.
12. Вишнякова А. В. Бактериальный воспалительный процесс при различных острых и хронических заболеваниях бронхов и легких // Механизмы воспаления бронхов и легких и противовоспалительная терапия / Под ред. Г. Б. Федосеева. СПб., 1998. С. 67–82
13. Егоров А.М. Хламидии: Молекулярная организация клетки и некоторые особенности патогенеза инфекций /А.М. Егоров, Ю.О. Сазыкин //Антибиотики и химиотерапия. –2000. –Т. 45, №4. –С. 3-5.
14. Жестков А. В., Косарев В. В., Бабанов С. А. Хроническая обструктивная болезнь легких у жителей крупного промышленного центра: эпидемиология и факторы риска // Пульмонология. 2009. №6. С.53-57.
15. Зубков М.Н. Алгоритм терапии острых и хронических инфекций верхних и нижних дыхательных путей // РМЖ. – 2009. – т.17. – № 2.– С. 123–13.
16. Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Савченко А.А. Микробиоценоз слизистой оболочки носа и риносинуситы// Красноярск:КрасГМУ, 2011. - 180 с
17. Катосова Л.К. Клинико биологическая оценка пневмотропной флоры при острых и хронических бронхолёгочных болезнях у детей: Автореф. дис. д.б.н. — М., 1990.
18. Казаков С.П. Особенности диагностики и лечения атипичных легочных заболеваний в Российском госпитале в Косово / С.П.Казаков, Ю.В. Папенко, Б. Хоркаи // Военно-медицинский журнал. –2004. - №3. – С. 38-39.
19. Карапетян Т.А. Внебольничная пневмония сегодня/ Т.А. Карапетян//Вестник Санкт-Петербургского университета Серия 11: Медицина.-2008.- №1.-С.1-14.

20. Козлов Р.С. Пневмококки: уроки прошлого -взгляд в будущее. Смоленск: МАКМАХ, 2010. 128с
21. Лабинская, А.С. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций / А.С. Лабинская, Н.Н. Костюкова, С.М. Иванова. - М.: Бином, 2010. – 1115 с.
22. Манзенюк И.Н. Пневмония, вызванная *Chlamydophila* (*Chlamydia*) *pneumoniae*: клиника, диагностика и лечение / И.Н. Манзенюк, М.С. Воробьева, С.С. Ямникова // Антибиотики и химиотерапия. – 2001. – Т. 46. - № 1. – С. 22-29.
23. Манзенюк И.Н., Воробьева М.С., Ямникова С.С. Пневмония, вызванная *Chlamydophila* (*Chlamydia*) *pneumoniae*: клиника, диагностика и лечение. Антибиотики и химиотерапия, 2001; 46: 22-29.
24. Петрова А.И. [и др.] Внебольничная пневмония у пожилых пациентов // Клиническая геронтология. - 2006. – Т. 12, № 8. - С. 45-50.
25. Мартынова А.В. Анализ заболеваемости пневмококковыми инфекциями // Врач. 2008. №3. С.72-73
26. Мартынова А.В. Проблемы идентификации *Streptococcus pneumoniae* при формировании устойчивых к оптохину штаммов возбудителя // Журн. микробиол. 2005. № 6. С.65-89.
27. Маркелова Н.Н., Хотько Н.И. Особенности носительства *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* у детей с хроническими заболеваниями верхних дыхательных путей// Фундаментальные исследования. – 2013. – № 3-1. – С. 110-113
28. Меньшиков В.В. Методики клинических лабораторных исследований: справочное пособие. Том 3. Клиническая микробиология. - М.: Лабора 2009. – С. 716-717.
29. Онищенко Г.Г. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности.// МУ 1.3.1888-04 Москва, 2004 г

30. Онищенко Г.Г. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. //МУ 4.2.2039-05 Москва,.2005 г
31. Прозоровский С.В. // Проблемы инфектологии. — М.: Медицина, 1991.
32. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы. В 2-х томах. Том 1. Генная и белковая инженерия. - «Наука» Москва. 2004. 530с.
33. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. – М.: Медиа Сфера, 2002.
34. Синопальников, А.И. Внебольничная пневмония: диагностика и дифференциальная диагностика / А.И. Синопальников // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. - 2003. – № 3. - С. 7-9.
35. Синопальников, Р.С. Козлов, И.Е. Тюрин, С.А. Рачина. Внебольничная пневмония у взрослых: клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике: пособие для врачей. – М. 2010. – 60 с.
36. Синопальников А.И. «Трудная» пневмония./ А.И. Синопальников, А.А. Зайцев // - М. -2010. – 56с.
37. Синопальников А.И. Тяжелая внебольничная пневмония: этиологическая структура /А.И. Синопальников, О.В. Фесенко, Ю.Г. Тихонов, В.К. Дуганов // Антибиотики и химиотерапия. –2001. –Т. 46, №6. –С. 6-11.
38. Синопальников, А. И. Внебольничная пневмония у взрослых А. И. Синопальников // Consiliummedicum. – 2007. – Т. 9, №3. – С. 5-16.
39. Страчунский Л.С. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae*: Методические рекомендации под ред. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – № 1. – Т. 2. – С. 88-98.
40. Таточенко В. К Бронхиты у детей: пособие для врачей. – М., 2004.-95 с

41. Трубников Г.В. Внебольничная пневмония с атипичной (микоплазменной и хламидийной инфекцией)/ Г.В. Трубников, И.Г. Полякова, Л.Ю. Бутакова// Терапевтический архив.- 2009.- Т. 81.- №1.- с.16-20.
42. Терентьева, В. П. Справочник по пульмонологии / В. П. Терентьева. – Ростов- на-Дону: Феникс, 2000. – 384 с.
43. Херрингтон, С. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: пер. с англ. / С. Херрингтон, Д. Макги. - М.: Мир, 1999. - 558 с.
44. Чучалин А.Г. Пневмония с точки зрения доказательной медицины / А.Г. Чучалин, А.Н. Цой, В.В. Архипов, И.Б. Левшин. – М. –2002. – 111 с.
45. Чучалин А.Г. Хроническая обструктивная болезнь легких: практическое руководство для врачей. — М., 2004.
46. Чучалина А. Г. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (GOLD) . - Москва : Атмосфера, 2003. - 96 с.
47. Чучалин [идр.] А.Г. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике: пособие для врачей // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2010. – Т. 12, № 3. - С. 186-226.
48. Чучалин А.Г. Пневмония с точки зрения доказательной медицины / А.Г. Чучалин, А.Н. Цой, В.В. Архипов, И.Б. Левшин. – М. – 2002. – 111 с.
49. Чучалин, А. Г. Пневмония / А. Г. Чучалин, А. И. Синопальников, Л. С. Страчунский. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2006. – 464 с.
50. Чучалин А.Г., соавт., 2006
51. Чучалин А.Г. Внебольничная пневмония у взрослых. Практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике /А.Г. Чучалин, А.И. Синопальников, Р.С. Козлов, И.Е. Тюрин, С.А. Рачина. – М. 2010. – 60 с.

52. Чучалин. А. Г. Рациональная фармакотерапия заболеваний органов дыхания / Под общ. ред. М., 2004
53. Чубукова О.А. Совершенствование эпидемиологического и микробиологического мониторинга в системе эпидемиологического надзора за внебольничными пневмониями. //Автореф. дис. канд. мед.наук. - Нижний Новгород. – 2012. – 26с.
54. Чемерис А.В. [и др.]. ПЦР, ЛЦР и ГЦР – цепные реакции нуклеиновых кислот в режиме реального времени // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2005. – Т. 1, № 2. – С. 5-14.
55. Шахгильдян В.И. Клиническая характеристика, диагностика и лечение цитомегаловирусной инфекции // Мед. кафедра. – 2003. - №1. – С. 51-59.]
56. Agrawal A, Murphy TF. Haemophilus influenzae infections in the H. influenzae type b conjugate vaccine era. J Clin Microbiol. 2011;49(11):3728–3732. doi: 10.1128/JCM.05476-11.];
57. A de Roux [et al.] Mixed community-acquired pneumonia in hospitalised patients / // Eur. Respir. J. - 2006. - Vol. 27, № 4. – P. 795-800
58. Arnold F.W. [et al.]. A worldwide perspective of atypical pathogens in community-acquired pneumonia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 2007. – Vol. 175, № 10. – P. 1086-93.
59. BTS guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease. The COPD Guidelines Group of the Standards of Care Committee of the BTS. //Thorax 1997; 52: Suppl. 5.S1-S28.
60. Ball P. et al, 2002
61. Cassire, H.A. Aspiration pneumonia / H.A. Cassire, M.S. Neiderman // Lipoid pneumonia. End lung abscess / eds. G.L. Baum, J.D. Crapo. – N. Y.: Lippincott-Raven, 1998. – P. 645-655.
62. Detection of Haemophilus influenzae in respiratory secretions from pneumonia patients by quantitative real-time polymerase chain reaction / G.M.

Abdeldaim [et al.] // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 64, № 4. – P. 366-73.

63. Erwin AL, Smith AL. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. Trends Microbiol. 2007;15(8):355–362. doi: 10.1016/j.tim.2007.06.004.

64. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia / D.R. Murdoch [et al.] // J. Clin. Microbiol. - 2003. – Vol. 41, № 1. – P. 63-6.

65. Foxwell AR, Kyd JM, Cripps AW. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention. MicrobiolMolBiol Rev. 1998;62(2):294–308.

66. Kiehn T.E., Verhoef J. *Haemophilus* spp. In: Armstrong D., Cohen J., editors. Infectious diseases. Harcourt Publishers Ltd; 1999. p.8-20.7-20.11.

67. Loddenkemper R., Gibson G.J., Sibille et al. European Lung White Book. The first comprehensive survey on respiratory health in Europe. - 2003. - P. 34–43.

68. Marimon J.M. Vaccines for *Streptococcus pneumoniae* // Materials of the 5th ESCMID School, Santander, Spain, June 10-16, 2006.

69. Mogulkoc N., Karakurt S., Isalska B. et al. Acute purulent exacerbation of chronic obstructive pulmonary deasese and *Chlamydia pneumoniae* infection // Am J RespirCrit Care Med. - 1999. - Vol. 160. - P. 349–53.

70. Murray C. J., Lopez A. D. Evidence–based health policy–lessons from the Global Burden of Disease Study. // Science 1999. - Vol.274. – P. 740-3.

71. Murphy TF, Faden H, Bakaletz LO, Kyd JM, Forsgren A, Campos J, Virji M, Pelton SI. Nontypeable *Haemophilus influenzae* as a pathogen in children. Pediatr Infect Dis J. 2009; 28(1):43–48.

72. Miyashita, N. Etiology of community-acquired pneumonia requiring hospitalization in Japan / N. Miyashita, H. Fukano, Y. Niki // Chest. – 2001. – Vol.

119. – P. 1295–1296.

73. Meilan K. Han, Dirkje Postma, David M. Mannino, Nicholas D. Giardino, Sonia Buist, Jeffrey L. Curtis, And Fernando J. Martinez Gender and chronic obstructive pulmonary disease // American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine. 2007. Vol. 176, No. 12. P. 1179-1184

74. Pediatric Parapneumonic Effusions / G.E. Utine, A. Pinar // Respiration. – 2008. – Vol. 75. – P. 437–442.

75. Quantitative detection of Streptococcus pneumoniae in nasopharyngeal secretions by Real-Time PCR / O. Greiner [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2001. - Vol. 39, № 9. – P. 3129–3134.

76. Reza Shariatzadeh, M. Differences in the features of aspiration pneumonia according to site of acquisition: community or continuing care facility / M. Reza Shariatzadeh, J.Q. Huang, T.J. Marrie // J. Am. Geriatr. Soc. - 2006. – Vol. 54, № 2. – P. 296-302.

77. Seemungal TAR, Donaldson GC, Paul EA et al. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease // Am J Respir Crit Care Med. – 1998. P. 157. (Seemungal TAR, Donaldson GC, Paul EA et al., 1998; Connors AF Jr, Dawson NV, Tomas C et al., 1996)

78. Sethi S. Bacteria in exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Phenomenon or Epiphenomenon?. The Proceedings of the American Thoracic Society. — 2004. — 1. — P. 109-14

79. Sliql, W. I. Severe community-acquired pneumonia / W. I. Sliql, T. J. Marrie // Crit. Care Clin. – 2013. – Vol. 3. – P. 563-601.

80. Sethi S. // The Proceedings of the American Thoracic Society.– 2004.– Vol.1.– P.109–114

81. Strålin, K. Evaluyion of a multiplex PCR for bacterial pathogens applied to bronchoalveolar lavage / K. Strålin, J. Korgaard // Eur. Respir. J. – 2006. – Vol. 28. – P. 568–575.

82. Utine, G.E. Pleural Fluid PCR Method for Detection of

Staphylococcus aureus, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in pediatric parapneumonic effusions. 2007

83. Vos T, Flaxman Ad, Naghavi M, Et Al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010// *Lancet*. 2012. № 280. P.2163–96.

84. Woodhead, M. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections – full version / M. Woodhead [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2011. – Vol. 6. – P. 1-59.

85. Zalacain, R. Community-acquired pneumonia in the elderly: Spanish multicentre study / R. Zalacain, A. Torres, R. Celis // *Eur. Respir. J.* – 2003. – Vol. 21. – P. 294- 302.

ПРИЛОЖЕНИЕ



Вестник Башкирского государственного медицинского университета

сетевое издание

ISSN 2309-7183



№3, 2016

vestnikbgmu.ru

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

Вестник Башкирского государственного медицинского университета

сетевое издание

№3, 2016 г.

Редакционная коллегия:

Главный редактор: проф. Павлов В.Н. – ректор Башкирского государственного медицинского университета (Уфа)

Зам. главного редактора: проф. Нартайлаков М.А. (Уфа)

Члены редакционной коллегии: проф. Катаев В.А. (Уфа); проф. Ахмадеева Л.Р. (Уфа); доц. Цыплин А.А. (Уфа); проф. Галимов О.В. (Уфа); проф. Загидуллин Н.Ш. (Уфа); проф. Малюцкий В.А. (Уфа); доц. Стрижков А.Е. (Уфа); проф. Еникеев Д.А. (Уфа); доц. Гоктаров А.В. (Уфа); проф. Мамзотов А.Р. (Уфа); проф. Гильмамов А.Ж. (Уфа); проф. Минясов Б.Ш. (Уфа); проф. Вакторов Т.В. (Уфа); проф. Валишин Д.А. (Уфа); проф. Сахмутдинова И.В. (Уфа); проф. Садриядинов М.А. (Уфа); проф. Новикова Л.Б. (Уфа); проф. Веракова И.В. (Уфа); проф. Моротова Т.В. (Уфа); проф. Гильмутдинова Л.Т. (Уфа).

Редакционный совет:

Чл.-корр. РАМН, проф. Тимурбулатов В.М. (Уфа), проф. Бакиров А.А. (Уфа), проф. Гажиев Ш.Х. (Уфа), доц. Шейбаев Г.А. (Уфа), проф. Мулдашев Э.Р. (Уфа), проф. Вакторов В.В. (Уфа), проф. Кубышкин В.А. (Москва), проф. Гальперин Э.И. (Москва), проф. Вишневский В.А. (Москва), чл.-корр. РАМН, проф. Алеев Ю.Г. (Москва), чл.-корр. РАМН, проф. Чучалин А.Г. (Москва), чл.-корр. РАМН, проф. Долгушин И.И. (Челябинск), чл.-корр. РАМН, проф. Котельников Г.П. (Самара), проф. Сеняков А.С. (Казань).

Состав редакции сетевого издания «Вестник Башкирского государственного медицинского университета»:

гл. редакция – к.м.н. Катаев М.Ш.

ответственный секретарь – к.м.н. Рыбалко Д.Ю.

научный редактор – к.фарм.н. Файзуллин Р.Р.

технический редактор – к.м.н. Насыбуллин И.М.

художественный редактор – доц. Захарченко В.Д.

технический секретарь редакции - Захарченко Р.Р.

корректор – Брагина Н.А.

корректор-переводчик – к.ф.н. Майорова О.А.

ЗАРЕГИСТРИРОВАН В ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЕ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ СВЕДИ, ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
И МАССОВЫХ КОММУНИКАЦИЙ 26.07.2013, НОМЕР СВИДЕТЕЛЬСТВА Эл № ФС 77 - 54905.

© ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, 2016

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОЙ ИНФЕКТОЛОГИИ

*Всероссийская научно-практическая
конференция с международным участием*

Уфа

**12-14 апреля
2016 года**

В данный номер «Вестника БГМУ» вошли статьи победителей конкурса научно-исследовательских работ, проводимого в рамках Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты современной инфектологии», получившей финансовую поддержку ФГБУ «Российский фонд фундаментальных исследований», проект №16-04-20105

ответственный редактор – д.м.н., проф. Г.М. Хасанова

Уразбахтина Э.В. - студентка 5 курса,
Файзуллина А.Р. - студентка 4 курса
Медико-профилактический факультет
ГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет
Минздрава России, г. Уфа, Россия
Научные руководители – Мирсаяпова И.А., к.м.н.,
Мавзютов А.Р. проф., д.м.н.
ГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет
Минздрава России, г. Уфа, Россия

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ ПРИ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Инфекционная патология дыхательных путей остается одной из наиболее актуальных проблем пульмонологии. По некоторым данным ежегодно количество зарегистрированных случаев только внебольничной пневмонии в России достигает 1,5 млн. [9]. Спектр этиологических агентов при инфекционных поражениях дыхательных путей чрезвычайно широк. По некоторым данным, например, при внебольничной пневмонии наиболее значимы *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*, выявляемые в 30–50 и 10% случаев заболеваний соответственно [3, 7]. Актуальны, но обнаруживаются существенно реже: *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* [1, 2, 8].

В последние годы, однако, все больше данных за то, что инфекционная патология органов дыхательной системы может быть обусловлена нетуберкулезными микобактериями, количество видов которых достигает 150, из них 40 – имеют медицинское значение [10-14]. Столь существенную разницу в данных об этиологической структуре инфекционной патологии органов дыхательной системы объективно связывают с различной информативностью применяемых лабораторных методов этиологической верификации клинического диагноза, среди которых в настоящее время наиболее перспективными являются молекулярно-генетические [4, 5].

Исходя из вышесказанного целью настоящего исследования явилась оценка частоты встречаемости нетуберкулезных микобактерий при различных формах патологии органов дыхательной системы.

Материалы и методы. Для достижения поставленной цели нами была выделена тотальная ДНК из 197 образцов мокроты больных (18-80 лет), находившихся на стационарном лечении в пульмонологических отделениях с различными формами нетуберкулезной патологии органов дыхательной системы: внебольничная пневмония - 56 случаев, бронхиальная астма - 32, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) - 66, острый бронхит - 35, саркоидоз - 2, плеврит – 3 и эмпиема плевры - 3. Учитывая, что в настоящее время медицинское значение имеет свыше 40 видов нетуберкулезных микобактерий, многие из которых часто обнаруживаются во внешней среде, нами были подобраны и синтезированы (ООО «Биоскрин», Россия) родоспецифичные праймеры, обеспечивающие детекцию *Mycobacterium spp.* методом ПЦР. Для статистической достоверности рассчитывали критерий χ^2 и уровень его значимости [6].

Результаты исследования: В результате проведенных исследований родоспецифичные фрагменты ДНК *Mycobacterium spp.* в исследованных образцах были обнаружены в 41,1% (у 23 больных) случаев при внебольничной пневмонии, при бронхиальной астме в 12,5% (у 4 больных), при остром бронхите в 40% (у 14 больных), при ХОБЛ в 16,6% (у 11 пациентов). У больных саркоидозом и плевритом ДНК *Mycobacterium spp.* была обнаружена у одного больного из двух исследуемых, в случае с диагнозом эмпиема плевры ДНК *Mycobacterium spp.* была обнаружена у двух пациентов из трех исследуемых.

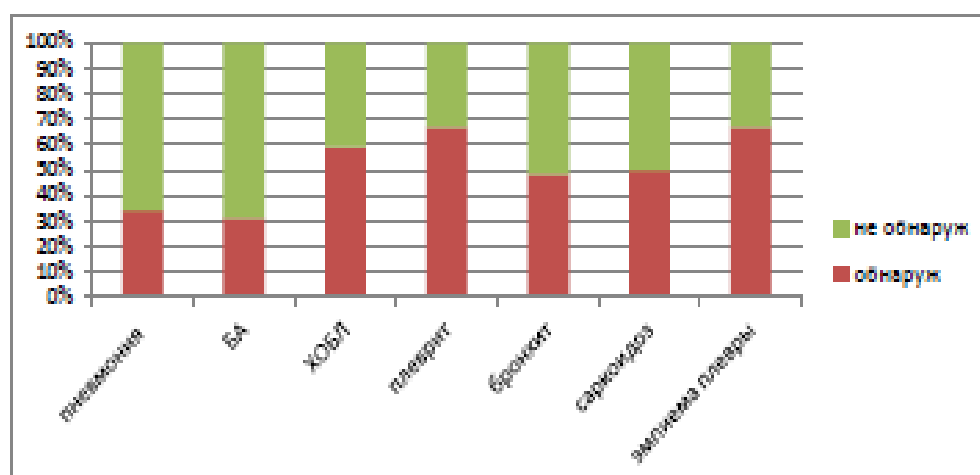


Рисунок 1. Частота обнаружения родоспецифичных фрагментов ДНК *Mycobacterium spp.* при различных формах инфекций дыхательных путей легких.

Расчет достоверности различий частоты обнаружения родоспецифичных фрагментов ДНК *Mycobacterium spp.* при различных формах инфекционной патологии органов дыхательной системы показал,

что при ПЦР исследовании фрагменты ДНК *Mycobacterium spp* достоверно чаще обнаруживались в образцах пациентов с диагнозами «плеврит», «эмпиема плевры» и «ХОБЛ». При этом основное заболевание характеризовалось более тяжелым клиническим течением.

Выводы: ДНК *Mycobacterium spp* обнаруживается в мокроте при инфекционных поражениях органов дыхательной системы. Вероятность их этиологического значения наиболее высока при внебольничной пневмонии, ХОБЛ и бронхиальной астме.

Список литературы

1. Бедило Н.В., Воробьева Н.А., Исмаилова Н.В., Вещагина Н.А. Эпидемиология внебольничных пневмоний в городе Архангельске // Экология человека - 2013; - 8: - С. 45-51.
2. Белоцерковская Ю.Г., Синопальников А.И. Роль *Chlamydomphila pneumoniae* в бронхолегочной патологии человека // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия - 2008; - 10(1): - С. 15-24.
3. Козлов Р.С. Пневмококки: уроки прошлого – взгляд в будущее - Смоленск: МАКМАХ, - 2010.
4. Мавзютов А.Р., Мирсаяпова И.А., Хасанова Г.Ф., Баймиев А.Х. Сравнительная оценка информативности методов этиологической диагностики внебольничной пневмонии // Клиническая лабораторная диагностика - 2012; - 12: - С. 35-38.
5. Мавзютова Г.А., Кузовкина О.З., Мирсаяпова И.А. Диагностическое значение современных методов микробиологической верификации внебольничной пневмонии в клинической практике // Клиническая лабораторная диагностика - 2015; - 60(12): - С. 31-34.
6. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва - М.: МедиаСфера, - 2002. - 312 с.
7. Скребкова Л.Д. Спектр возбудителей и характер иммунного ответа при внебольничной пневмонии у лиц разных возрастных групп / Дисс. ... канд. мед. наук - Владивосток; - 2010.
8. Тартаковский И.С. Стандарты лабораторной диагностики легионеллеза и их применение во время эпидемической вспышки пневмоний в г. Верхняя Пышма // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии - 2008; - 2: - С. 16-19.
9. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Тюрин И.Е., Рачина С.А. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике: пособие для врачей // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия - 2010; - 12 (3): - С. 186-226.

10. Daley C.L., Griffith D.E. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 2010; - 14(6): - P. 665-671.
11. Falkinham J.O. Nontuberculous mycobacteria in the environment // *Clin Chest Med.* - 2002. - Vol.23. - P. 529-551.
12. Griffith D.E., Aksamit T., Brown-Elliott B.A. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous myco-bacterial diseases // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* - 2007; - 175: - P. 367-416.
13. Murray P.R., Shea Y.R. Pocket guide to clinical microbiology - 2006: - P. 15-21.
14. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. // *Clin. Microbiol. Rev.* - 2003; - 16: - P. 319-354.

© Уразбахтина Э.В., Файзуллина А.Р., 2016

УДК 364.65

Уразметова Э.Р. студентка 4 курса
специальность «Социальная работа»
ФГБОУ ВПО Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия
Хасанова А.Н., студентка 5 курса
специальность «Лечебное дело»
ГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет,
г. Уфа, Россия
Научный руководитель – Хасанова Г.М., д.м.н., профессор
ГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет,
ФГБОУ ВПО Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия

СТИГМАТИЗАЦИЯ ВИЧ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ЛЮДЕЙ КАК АКТУАЛЬНАЯ МЕДИКО-СОЦИАЛЬНАЯ ПРОБЛЕМА

XXI столетие уже именуется веком информатизации, инновационных исследований и нанотехнологического прогресса. Конечно же, заслуженно. Но также новое столетие прославилось себя невиданным по сравнению с прошлым распространением социально значимых заболеваний. Одним из широко известных и распространённых является ВИЧ-инфекция. ВИЧ поражает клетки крови человека, имеющие на своей поверхности CD4-рецепторы: Т-лимфоциты, макрофаги и дендритные клетки. Инфицированные вирусом Т-лимфоциты гибнут из-за разрушения вирусом,

Справка о проверке на Антиплагиат студенки МБ401
Файзуллиной Альбины Рамилевны

Информация о документе:

Имя исходного файла:	ДИПЛОМ на Антиплагиат.docx
Имя компании:	Башкирский государственный медицинский университет
Тип документа:	Прочее
Имя документа:	Диплом Файзуллиной
Дата проверки:	23.06.2016 8:52
Модули поиска:	Диссертации и авторефераты РГБ, Интернет (Антиплагиат), Кольцо вузов, Модуль поиска ЭБС "Лань"

Текстовые статистики:

Текстовые статистики:

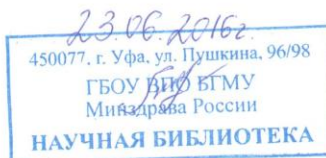
Индекс читаемости:	сложный
Неизвестные слова:	в пределах нормы
Макс. длина слова:	в пределах нормы
Большие слова:	в пределах нормы

Оригинальные блоки: 79.84%

Заемствованные блоки: 20.16%

Заемствование из "белых" источников: 0%

Итоговая оценка оригинальности: **79.84%**



Отзыв о прохождении дипломной практики

Научного руководителя студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Файзуллиной Альбины Рамилевны

по теме:

«Сравнительная оценка частоты встречаемости *Streptococcus pneumoniae* и
Haemophilus influenzae при различных формах легочной патологии
человека ».

Студентка Файзуллина А.Р., проходила дипломную практику в Башкирском государственном медицинском университете на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии. За время прохождения дипломной практики показала себя как ответственная, целеустремленная, исполнительная, инициативная студентка. В процессе работы над дипломной работой, Файзуллина А.Р. изучила большой объем литературных источников, для проведения экспериментальной части практики освоила основные молекулярно-биологические и микробиологические методы исследований. Файзуллина А.Р. хорошо ориентируется в современных биологических базах данных и имеет хорошую теоретическую подготовку.

Результат дипломной практики: Файзуллина А.Р. заслуживает отличной оценки.

Научный руководитель:

к.м.н.

Подпись: 
Заведующий
Ученый секретарь
Минздрава России

Миреяпова И.А.

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки Файзуллиной А.Р.

Медико-профилактического факультета с курсом микробиологии

Башкирского государственного медицинского университета

Тема: «Сравнительная оценка частоты встречаемости *S.pneumoniae* и *H.influenzae* при различных формах легочной патологии человека ».

Рецензируемая дипломная работа посвящена сравнительной оценке частоты встречаемости *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* при различных формах легочной патологии человека.

Были исследованы образцы мокроты методом ПЦР и проведена оценка частоты встречаемости микроорганизмов при хронической обструктивной болезни легких, внебольничной пневмонии, бронхиальной астме и бронхите. Работа построена по традиционной схеме: актуальность, обзор литературы, описание целей, задач и методов исследований, представление собственных данных, описание результатов, их обсуждение, выводы и список цитированных источников.

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

высший научный сотрудник
ЦНИЛ

д.м.н., профессор Фархутдинов Р.Р.



РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки Файзуллиной А.Р.
Медико-профилактического факультета с курсом микробиологии
Башкирского государственного медицинского университета
по теме: «Сравнительная оценка частоты встречаемости
S. pneumoniae и *H. influenzae* при различных формах легочной патологии
человека»

Рецензируемая дипломная работа посвящена оценке частоты встречаемости *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* при различных формах легочной патологии человека.

Работа построена по традиционной схеме, включает актуальность, обзор литературы, описание целей, задач и методов исследований, представление собственных данных, описание результатов, их обсуждение, выводы и список цитированных источников. Были исследованы образцы мокроты методом ПЦР и проведена оценка частоты встречаемости микроорганизмов при хронической обструктивной болезни легких, при внебольничной пневмонии, бронхиальной астме и бронхите.

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

Научный сотрудник лаборатории
молекулярной биологии и
нанобиотехнологии ИБГ УНЦ РАН

к.б.н. Иванова Е.С.

