

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

На правах рукописи



Бижбалова Лина Олеговна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ ДЛЯ
ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА *SAMPYLOBACTER* В
РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ**

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
профессор



А.Р.Мавзютов

Научный консультант:
кандидат биологических наук



Л.Р.Хакимова

Уфа – 2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Микрофлора кишечника и ее роль в развитии заболеваний	8
1.2. Нарушение микробиоценоза желудочно-кишечного тракта у больных	11
1.3. Общие представления о <i>Campylobacter</i>	13
1.4. Кампилобактерии в стуле больных синдромом раздраженного кишечника	15
1.5. Патогенность <i>Campylobacter fetus subspecies</i> в структуре акушерско-гинекологических инфекционных осложнений беременных	17
1.6. Эпидемиология	19
1.7. Маркеры кишечного воспаления при заболеваниях кишечника	20
1.8. Лабораторные методы исследования	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Клинико-лабораторное обследование больных	25
2.2. Выделение бактериальной ДНК	25
2.3. Подбор родоспецифичных праймеров	28
2.4. Амплификация участков ДНК методом ПЦР	29
2.5. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле	33
2.6. Высокотемпературная демаскировка биоптатов (1 способ)	34
2.7. Выделение ДНК из биоптатов	35
2.8. Депарафинизация и оптимизация метода выделения ДНК из ткани, фиксированной в формалине и заключенной в парафин (2 способ)	37
2.9. Амплификация участков ДНК методом полимеразной цепной реакции с помощью подобранных праймеров	39
2.10. Проведение ПЦР в режиме реального времени	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1. Подбор оптимальных праймеров для ПЦР-идентификации	42

Campylobacter spp.

3.2. Проверка специфичности праймеров на <i>Campylobacter spp.</i>	44
3.3. Анализ представленности патогенных <i>Campylobacter</i> в исследуемом клиническом материале	44
3.4. Выделение ДНК из биоптатов	45
3.5. Результаты ПЦР-анализа и ПЦР в режиме реального времени	46
3.6. Оптимизация условий для проведения ПЦР в режиме реального времени	47
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	49
ВЫВОДЫ	50
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	51

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БК – болезнь Крона

НЯК – неспецифический язвенный колит

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ВЗК – воспалительное заболевание кишечника

СО – слизистая оболочка

СРК - синдром раздраженного кишечника

ОКИ – острая кишечная инфекция

Аг – антиген

РА – реакция агглютинации

РСК – реакция связывания комплимента

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

НК – нуклеиновая кислота

ПК – положительный контроль

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РТ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

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

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Неспецифический язвенный колит (НЯК) является одной из сложнейших проблем в современной гастроэнтерологии. В его основе лежит диффузное язвенно-воспалительное поражение толстой кишки, что клинически проявляется частым жидким стулом с гноем и кровью, кишечными кровотечениями, сильными болями в брюшной области, тенезмами и запорами (Дорофеев, 2004). Предполагается, что в патогенезе данного заболевания имеет значение иммунологическая реактивность, дисбиотические сдвиги, различные аллергические реакций, а также генетические факторы и психические нарушения.

По данным ВОЗ распространенность НЯК по миру составляет от 50 до 230 случаев на сто тысяч населения. А ежегодный прирост больных заболевание в мире достигает от 5 до 20 случаев на сто тысяч населения. Смертность от воспаления кишечника, в том числе от болезни Крона и неспецифического язвенного колита, составляет примерно в мире 6 случаев на 1 млн населения, в России - 17 случаев на один миллион населения. В России чаще всего диагноз ставится через несколько лет от момента появления первых симптомов данного заболевания.

Хотя точная этиология заболевания до сих пор не ясна (Полужктова, 2014), считается, что в основе важное значение имеет воспаление преимущественно аутоиммунного характера и также активное действие различных бактериальных агентов (Дорофеев, 2014). К таким агентам относятся бактерии рода *Campylobacter*, которые имеют тропность к тканям слизистой оболочки тонкой и толстой кишки, обладающие высокой адгезивностью и инвазивностью по отношению к энтероцитам и колоноцитам, а также продуцируют эндотоксин и экзотоксины (холероподобный энтеротоксин, дизентериеподобный цитотоксин и цитолетальный токсин). Клиническое значение имеют виды *Campylobacter*

jejuni, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus subsp. fetus*, *Campylobacter psaliensis*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter jejuni subsp. doylei*.

Campylobacter spp. концентрируются в слизистой оболочке толстого кишечника, а в кале их концентрация очень низкая. Они крайне плохо окрашиваются, не растут на простых питательных средах и не растут в воздушной среде.

Сочетание заболевания с различными проявлениями других симптомов вызывает разного рода трудности в его диагностике на начальных этапах. С момента возникновения первой симптоматики до установления точного диагноза может пройти несколько месяцев и, в редких случаях, лет. (Langan, 2007). Лабораторная диагностика язвенного колита предполагает, изначально, дифференцировку заболевания с инфекционными поражениями кишечника, ишемическим колитом и болезнью Крона. Вместе с тем, при НЯК на первый план часто выходят внекишечные проявления, которые встречаются практически у половины пациентов. В связи с этим целью дипломной работы является молекулярно-генетическая конструкция для детекции бактерий рода *Campylobacter* у клинически больных.

Цель работы. Разработка прототипа тест-системы для родоспецифичной детекции *Campylobacter spp.* в биоптатах для этиологической диагностики воспалительных заболеваний кишечника и оценки эффективности их этиотропной терапии в динамике.

Задачи исследования:

1. Сбор клинического материала.
2. Выделение бактериальной ДНК из собранного клинического материала больных.
3. Подбор родоспецифичных праймеров для выявления бактерий рода *Campylobacter*.
4. Поиск эффективного метода демаскировки биоптатов.
5. Оптимизация работы с подобранными праймерами и биоптатами.

Практическая значимость. Подобранные олигонуклеотидные родоспецифичные праймеры к последовательности гена 16S рРНК *Campylobacter* различных видов позволит выявить в клиническом материале спектр вышеперечисленных возбудителей с помощью ПЦР. Предложенный подход позволит разработать оптимальный метод и наборы реагентов для пробоподготовки и ПЦР обнаружения *Campylobacter spp.* непосредственно в биоптатах, получаемых для гистологического исследования.

Область применения результатов исследования. Разработанная в ходе исследования методика демаскировки биоптатов применима для широкого использования, не требует дорогостоящей реагентики и непродолжительна во времени. Детекция бактерий рода *Campylobacter* может стать основой при постановке диагноза и дальнейшего этиотропного лечения больных. Результаты проделанной работы могут быть применимы в медицине, лабораторной диагностике для выявления *Campylobacter spp.* и при назначении висмутсодержащих препаратов против них.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Микрофлора кишечника и ее роль в развитии заболеваний

Желудочно-кишечный тракт является не только органом пищеварения, но и одним из самых важных звеньев иммунитета. Особенность его работы обусловлена действием многочисленных антигенов внешней среды (поступающей пищи, бактерий, вирусов и паразитов), большой площадью контактов с ними (у детей около 200 м²) и обязательным развитием защитных реакций, направленных на патогенные микроорганизмы и различные неорганические вещества (Александров, 2006).

Кишечник – один из самых больших и важных органов иммунной системы человека. Приблизительно четверть его слизистой оболочки состоит из иммунологически активной ткани, в которой находится около 80% иммунокомпетентных клеток (Александров, 2006).

Заселение пищеварительного тракта некоторыми видами и определенными штаммами бактерий приводит к образованию нормального сообщества микроорганизмов, обеспечивающего колонизационную резистентность организма к возбудителям кишечных инфекций. С современных позиций колонизационная резистентность относится к факторам неспецифической защиты. Общая масса микроорганизмов достигает у детей 1–1,5 кг и до 3–4 кг — у взрослых, составляя 50 - 60% сухого остатка кала. Биocenоз кишечника представлен более пятисот видов микроорганизмов, а вся его численность равна приблизительно тысячи, это в два раза больше числа всех клеток организма человека. Вся кожа и слизистые человека покрыты биопленкой, которая состоит из сотен видов микроорганизмов (Мечников, 1907).

Кишечная микрофлора обеспечивает важные сигналы для созревания иммунной системы и постоянно контролирует связанный с кишечником иммунный гомеостаз. Практически доказано, что для полноценного

созревания самого кишечника человека необходимо воздействие не только антигенов пищи, но и, что важнее, антигенов нормофлоры.

Основным иммуноглобулином кишечника является IgA, который вырабатывается местно плазматическими клетками, находящимися в собственной пластинке кишечника. Секреторный IgA связывает антигены вирусов и бактерий (нейтрализация вирусов, агглютинация бактерий), блокирует прикрепление вирусов и бактерий к слизистым оболочкам, стимулирует противобактериальную активность фагоцитов и лимфоцитов в отношении патогенных бактерий, связывает пищевые антигены и аллергены, которые способны провоцировать аллергические реакции (Александров, 2006; Урсова, 2006; Щеплягина, 2008). Доказана сильная отрицательная связь уровня бифидобактерий и концентрации секреторных иммуноглобулины класса А в фекалиях человека, что дало причину рассматривать определение концентрации секреторных иммуноглобулинов в кале как еще один дополнительный метод диагностики дисбактериоза.

Длительные хронические процессы ЖКТ однозначно нарушают микроэкологический баланс, угнетают колонизационную резистентность, приводят к повреждению функций нормальной флоры кишечника, снижают иммунный статус. В развитии хронической патологии желудочно-кишечного тракта в силу цикличности течения процесса наиболее важным является вопрос продления ремиссии и предупреждения начала обострения заболевания. Эта цель может быть достигаема при условии восстановления иммунной функции нормального биоценоза и флоры путем действенной коррекции нарушенного микробиоценоза. Следовательно, поиск новых подходов к лечению хронических заболеваний кишечника у людей, обеспечивающих одновременно купирование абдоминального синдрома, восстановление системы пищеварения, местного иммунитета и общий иммуномодулирующий статус, является одним из актуальных на сегодняшний день.

Воспалительные заболевания кишечника характеризуются неспецифическим иммунным воспалением стенки кишечника - поверхностным при ЯК и трансмуральным при БК. ЯК — хроническое заболевание, характеризующееся диффузным воспалением, находящееся в пределах слизистой оболочки (СО), поражает только толстую кишку на разном протяжении, в то время как при БК поражаются любые органы пищеварительного тракта - от полости рта до анального канала (Travis, 2010).

Частота нарушений микробиоценоза при воспалительных заболеваниях кишечника достигает от 66 до 93% (Халиф, 2004). У больных с ВЗК наблюдается потеря иммунологической толерантности к бактериям, населяющим весь желудочно-кишечный тракт (Biancone, 2002; Воробьев, 2008). Дисбиоз тонкой кишки при болезни Крона и толстой кишки при БК и ЯК из-за недостаточности илеоцекального клапана и снижением местного иммунного статуса, который проявляется в виде снижения содержания иммуноглобулинов класса А в соке тонкого кишечника, имеет важное значение в развитии избыточного бактериального роста в тонкой кишке, это дает объяснение колонизации тонкой кишки аэробной условно-патогенной микрофлорой или облигатными анаэробами. Поддержание постоянства внутренней среды кишечника и очищение межклеточного пространства от микроорганизмов с помощью аутофагии является целым каскадом реакций, которые нарушаются при ВЗК и в межклеточном пространстве крипт меняется соотношение числа видов микрофлоры и идет генетически детерминированное нарушение барьерной функции эпителиальных клеток, приводящее к хроническому воспалению слизистой оболочки кишечника (Wehkamp et al., 2007).

1.2. Нарушение микробиоценоза желудочно-кишечного тракта у больных

Микробиоценоз – эволюционно сложившаяся экологическая система, представляющая собой совокупность микроорганизмов, обитающих в определенном биотопе. Качественный и количественный состав микроорганизмов относительно стабилен для конкретного биотопа, но при этом видовой состав микроорганизмов подвержен влиянию факторов внешней среды, характера питания, возраста, времени года и уровня гигиены. (Ланкина, 2002; Григорьян и др., 2005).

Знания о микробном участии в ВЗК за последние годы увеличились во много раз. Изменение микрофлоры или «дисбактериоз» является одним из ключевых игроков в затяжном течении воспалительного процесса в ВЗК. Многочисленные исследования генома выявили дополнительные гены, участвующие в формировании врожденного иммунитета (в том числе полиморфизмов в генах, участвующих в аутофагии: ATG16L1 и IGRM). Эти события также стимулировали поиск конкретных патогенов, которые могут играть определенную роль в метаморфозе кишечника.

Воспалительные заболевания кишечника состоит из двух отдельных компонентов: язвенный колит и болезнь Крона, которые характеризуются хроническим воспалением, рецидивирующим в кишечнике у генетически предрасположенных лиц и подвергается воздействию определенных экологических факторов. ВЗК исторически считается «западной» болезнью, а в последнее десятилетие наблюдается её увеличение во всём мире. Выросло понимание участия микрофлоры кишечника при ВЗК. Интерес к этой области был в первую очередь связан с появлением культурально независимых методов, таких как секвенирование и метагеномика, которые являются гораздо более точными и сложным (Zoetendal, Rajilic-Stojanovic, 2008; Weinstock, 2012).

До этих радикальных научно-технических разработок основное внимание было сосредоточено на раскапывании патогенов среди огромного множества микроорганизмов в просвете кишечника, которые могли нести ответственность за инициирование воспалительных процессов, характерных для ВЗК (Prantera, Scribano, 1999). Эта работа была сродни поиска "иголки в стоге сена". Находки в последнее десятилетие перевернули всю эту концепцию, показывая, что кишечная микрофлора изменяется при ВЗК, предполагая, что, возможно, весь "стог" неисправен.

Основанием для этиопатогенеза ВЗК нормальной кишечной микрофлоры содержит 100 триллионов различных микроорганизмов, главным образом бактерии, охватывающих более 1100 распространенных видов. Дисбиоз, или окончательное изменение нормальной кишечной микрофлоры, является определяющим событием в развитии ВЗК. Переход от преобладающих симбионтов к потенциально вредным патобионтам является задокументированным (Kaig, 2011).

Большинство известных патогенных бактерий в организме человека принадлежат к типу протеобактерий, которые играют ключевую роль в ВЗК. Микробиологический анализ показал сдвиг в сторону увеличения бактериальных видов, относящихся к этому типу, предполагается, что они являются инициаторами хронического воспаления кишечника у пациентов.

1.3. Общие представления о *Campylobacter spp.*

Бактерии рода *Campylobacter* были связаны с различными заболеваниями животных и человека. *Campylobacter jejuni* и *Campylobacter coli* хорошо известны как безвредные бактерии для человека, они связаны с рядом клинических состояний, таких как диарея, сепсис и синдром Гийена-Барре (Moore et al., 2005).

Некоторые другие виды *Campylobacter spp.*, включая *Campylobacter concisus* рассматриваются в качестве новых патогенов человека. *C. concisus*

представляет собой изогнутые грамотрицательные бактерии, имеющие один полярный жгутик (Vandamme, 2005). *C. concisus* был впервые выделен Таннером в 1981г. В дальнейших исследованиях Macuch и Таннер сообщили о более высокой скорости изоляции *C. concisus* у больных на начальной стадии пародонтита по сравнению с людьми, имеющих здоровые десны (Macuch, 2000).

В последнее время *C. concisus* рассматривался в качестве нового возбудителя кишечных заболеваний человека (Newell, 2005). Выяснили, что *C. concisus* чаще обнаруживаются у детей в возрасте 0-9 лет и лиц в возрасте старше 60 лет по сравнению с другими возрастными группами. Эти наблюдения привели к выводу, что *C. concisus* следует рассматривать как синантропных бактерий и они являются патогенными для людей с ослабленной иммунной системой (Newell, 2005). В последнее время *C. concisus* связывают с воспалительным заболеванием кишечника (ВЗК). ВЗК представляет собой хроническое воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта, с двумя основными формами: болезнь Крона и неспецифический язвенный колит. Воспаление ЖК может произойти в любом месте желудочно-кишечного тракта ЖКТ, однако НЯК возникает в толстом кишечнике (Podolsky, 2002). Этиология ВЗК в настоящее время неизвестна. Понятно, что взаимодействие ряда факторов, в том числе генетика, окружающая среда, иммунная система и микрофлора кишечника способствует развитию ВЗК (Fiocchi, 1998; Podolsky, 2002; Sartor RB 2008). Несмотря на убедительные доказательства того, что кишечная микрофлора играет ключевую роль в развитии ВЗК, точные этиологический(ие) агент(ы) еще не выявлены (Sartor, 2008).

На сегодняшний день, распространенность *C. concisus* у взрослых пациентов с болезнью Крона до конца не выяснена. Кроме того, нет никакой информации относительно того вида *Campylobacter*, который колонизирует конкретные участки в кишечнике человека.

Возбудитель попадает в организм через ротовую полость, а затем в ЖКТ при несоблюдении правил личной гигиены, алиментарным путём, Инфицирующая доза составляет приблизительно 10⁵ бактерий. Для развития заболевания у лиц со сниженным иммунным статусом эта доза во много раз ниже. *Campylobacter spp.* обладают огромным спектром факторов патогенности: способны к адгезии, инвазии и продуцированию токсинов. Данный возбудитель обеспечивает широкий спектр клинических проявлений.

Бактерии, преодолевшие кислую среду желудка, внедряются в слизистую оболочку тонкой кишки и ее лимфоидные образования, выявлена способность кампилобактерий проникать в собственную пластинку слизистой оболочки в составе фагосомоподобных вакуолей через эпителиальную клетку и при помощи прямого межэпителиального проникновения. С помощью сканирующей микроскопии выяснили, что сначала бактерии при помощи жгутиков прикрепляются к эпителиальным клеткам, которые затем перфорируют клеточную мембрану. Кампилобактерии также имеют молекулы адгезинов помимо жгутиков, находящихся на поверхности самих бактерий, которые способны усиливать связь с энтероцитами (Иванов, 1995).

Помимо фактора адгезии в патогенезе кампилобактериоза важное место имеет инвазивная активность возбудителей, которые легко проникают через наружную мембрану эпителиальных клеток или через межклеточные промежутки эпителия. Эндотоксины вызывает различные реакции всего организма: лихорадку, рвоту, боли в животе, неспецифическую активацию клеток иммунной системы в виде синтеза ими широкого спектра цитокинов и внутрисосудистого свертывания крови и многое другое. Кампилобактерии продуцируют энтеротоксины, близкие по строению к холерному токсину и термолабильному токсину *E. coli*, а также несколько цитотоксинов (гемолизин, шигаподобный токсин, цитолетальный «взрывной» токсин). В месте входных ворот инфекции развивается воспалительный процесс различной степени выраженности. По лимфатическим сосудам

кампилобактерии попадают в мезентериальные лимфоузлы, возникает мезаденит, в патологический процесс может вовлекаться червеобразный отросток (Иванов, 1995; Wassenaar, 1997; Butzler, 2000; Tenkate, 2001).

Основную роль в возникновении аутоиммунной патологии при кампилобактериозе, а именно поражения периферической нервной системы, несут поверхностные липополисахариды клеточной стенки *C. jejuni*, эти молекулы обладают структурой, аналогичной структуре ганглиозидов (GM1, GD1a и GQ1b) плазматической мембраны синапсов, в результате выработки аутоантител к ним блокируется синаптическая передача импульса в терминалях моторных нейронов. Развитию аутоиммунных состояний после перенесенной кампилобактерной инфекции способствует генетическая предрасположенность, ассоциированная с HLA B35, HLA DQB1*03, HLA DR3 генами при поражении нервной системы и HLA B27 при возникновении артритов (Yuki, 1999; Tam, 2003).

Внекишечные поражения при кампилобактериозе являются следствием прогрессирования транзиторной бактериемии в септический процесс с развитием вторичных гнойных очагов в различных органах и тканях (эндокардит, менингит, энцефалит, перитонит, плеврит, артрит и др.), в таких случаях выделяют *C. fetus*. У лиц с выраженным иммунодефицитом генерализованные формы, предшествующего поражения ЖКТ не имеют ярко выраженные симптомы или не имеют их вовсе. Правильный ответ иммунной системы приводит к полной гибели возбудителя при участии полиморфноядерных лейкоцитов и моноцитов и последующему очищению организма от возбудителя.

1.4. *Campylobacter spp.* в содержимом кишки больных синдромом раздраженного кишечника

Синдром раздраженного кишечника - наиболее распространенное заболевание ЖКТ. Несмотря на прогресс последних лет в изучении

проблемы, этиология СРК остается нераскрытой. Среди возможных причин СРК рассматриваются такие факторы, как нарушения моторной функции ЖКТ, феномен висцеральной гиперчувствительности, влияние хронического стресса и длительных нарушений питания, различные воспалительные изменения кишечной стенки даже слабой степени выраженности, а также последствия перенесенной острой кишечной инфекции (Маев, Черемушкин, 2004). Такая форма болезни, как постинфекционный СРК, патогенетически больше всего зависит от взаимодействия патогенных с кишечной экосистемой, в последнее время привлекает все большее внимание специалистов.

Наличие слизи и крови в фекалиях больных подтверждает инвазивность кампилобактерий, а также воспалительные изменения и отек слизистой оболочки кишечника у больных с диарейным синдромом.

По данным статистики, среди осложнений ОКИ распространенность СРК достигает около 30%, самый большой риск его развития наблюдается после перенесенного кампилобактериоза (Rodriguez, Ruigomez, 1999). У человека колонизация *Campylobacter spp.* приводит к возникновению симптомов, варьирующих от неоформленного стула до тяжелой кровавой диареи, хотя и непродолжительной по времени (менее недели). Однако до 20% больных вскоре после ремиссии переносит рецидив заболевания, что указывает на наличие неполного иммунного ответа. Возможно, это связано с феноменом «иммунного уклонения» *C. jejuni*, обусловленного изменчивостью иммуногенного белка флагеллина, который кодируется двумя генами, способными к рекомбинации (Wassenaar, 1999). Установлено, что *C. jejuni* индуцирует продукцию колоноцитами провоспалительных цитокинов IL-8 и простагландина E2 (Dasti et al., 2009).

В связи с неполной гибелью сохраняющиеся колонии *C. jejuni* держат иммунную систему в активном состоянии и инфильтрацию воспалительными клетками кишечной стенки, что прямо воздействует на компоненты

кишечной нервной системы, нарушая местные моторные рефлексы и снижает порог болевой чувствительности.

За последние годы произошло много изменений в диагностике и лечении воспалительных заболеваний кишечника, это связано с возникновением знаний о патогенезе данной группы заболеваний, а также благодаря современным диагностическим возможностям (иммунологическим, иммуногистохимическим, генетическим и др.) и созданию новейших лекарств.

Campylobacter spp. - это мелкие, не образующие спор грамотрицательные, немного изогнутые палочки в виде запятых, напоминающие крыльев «чайки в полете» или спиралевидной, S-образной формы, длина 0,5-0,8 мкм, ширина 0,2-0,5 мкм, могут иметь один или два жгутика, могут двигаться быстро и винтообразно (данные фазово-контрастной или темнопольной микроскопии).

Campylobacter spp. достаточно быстро и легко погибают в окружающей среде из-за её воздействий (большое содержание кислорода, высушивание, температура, ультрафиолет, воздействие дезинфицирующих средств, кислая среда и т.п.). Растут *Campylobacter spp.* в микроаэрофильных условиях на агаровых средах с добавлением глицерина (1 %), при этом образуются мелкие колонии. Оптимальная температура роста - 37°C, pH 7,0; гемолиза не вызывают, не разжижают желатин, не свертывают молоко, образуют сероводород, дают положительную реакцию на каталазу. Имеют термостабильный О-антиген и термолабильный Н-антиген (Горелов, 2004).

1.5. Патогенность *Campylobacter fetus subspecies* в структуре акушерско-гинекологических инфекционных осложнений беременных

Campylobacter spp. (*C. fetus*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. rectus*), вызывающие заболевания, обладают различными антигенными особенностями и вирулентностью. *Campylobacter spp.* - это один из немногих видов бактерий,

которые способны к инвазии, вырабатывающие цитотоксические токсины, и до сегодняшнего дня антигенная структура и роль *Campylobacter* плохо изучена. У возбудителей МВЗ наблюдается генетическая трансформация, которая способна влиять на изменение патогенности, резистентности к защитным силам организма-хозяина и лекарственным препаратам. Доказательством такой изменчивости является изменение антигенной структуры микроорганизмов, которые могут оказывать влияние на характер, органотропность и особенности течения инфекционно-воспалительного процесса. Важная особенность *C. fetus* как одного из условно-патогенных бактерий заключается в том, что они способны проявлять плазмидозависимые признаки патогенности, например, как адгезия, резистентность к иммунному ответу макроорганизма, лизоцимной активности, клеточному и гуморальному иммунитету (Blaser et al., 1984). На сегодняшний день, данных о возрастании патогенности штаммов *C. fetus*, содержащие плазмиды, которые кодируют одновременно токсигенность и лекарственную резистентность, пока нет. Но нахождение таких штаммов может иметь большое значение, потому что привыкание к лекарственным препаратам будет способствовать рассредоточению энтеротоксигенных штаммов *Campylobacter fetus* в среде, в которой используются антибиотики в качестве кормовых добавок или лекарственных препаратов (Радчука, 1991).

Вирулентные штаммы *C. fetus* имеют различия от невирулентных более высокой скоростью репродукции, поэтому в их популяции много молодых клеток и большое содержание рибонуклеотидов, это способствует высокой базофилии клеток, а значит, вирулентные штаммы в живом состоянии более активно адсорбируют анилиновые красители, чем невирулентные. Ранее учеными (Григорьева и др., 1992) была установлена связь между активностью дыхательных ферментов (цитохромоксидаза, пероксидаза, каталаза) вирулентных штаммов *C. fetus* и их способностью быстро окислять анилиновые красители, что является подходящим методом оценки уровня

вирулентности, который заключается в быстром и простом определении ферментативной активности патогенных бактерий.

1.6. Эпидемиология

Главным источником *Campylobacter spp.* и причиной распространения инфекции для человека служат животные и птицы, в основном домашние и сельскохозяйственные (кролики, свиньи, коровы, козы, овцы, утки, иногда собаки и кошки), небольшую роль играют мелкие грызуны и дикие животные.

Заражение животных приводит чаще всего к их смерти, либо к длительному носительству, при котором они могут заражать других через выделения почву и воду. При убое таких животных происходит инфицирование мяса из кишечного содержимого. Не исключена способность попадания возбудителя в молоко при кампилобактериозном мастите у коров.

Передача кампилобактерий от человека к человеку происходит редко - заражение ребенка от взрослого человека. Заражение происходит алиментарным путём, фекально-оральный механизм при употреблении в пищу зараженных мясных и молочных продуктов, не претерпевших достаточную термическую обработку, а также плохо вымытых фруктов и овощей.

Возможен водный путь передачи инфекции. В практике есть случаи инфицирования *Campylobacter spp.* при контакте с больными животными, страдающих диарейным синдромом. У беременных возможна трансплацентарная передача инфекции.

К кампилобактериозу восприимчивы все возрастные группы, но чаще всего болеют дети до 10 лет, в частности новорожденные.

Лица, которые имеют частый (профессиональный) контакт с сельскохозяйственными животными, подвергаются повышенному риску инфицирования *Campylobacter spp.* Люди с ослабленным иммунитетом

имеют большую восприимчивость к кампилобактериозу, а также страдающие алкоголизмом, сердечно-сосудистыми заболеваниями, сахарным диабетом, злокачественными новообразованиями, после гастрэктомии и прохождения лечения иммунодепрессантами. Постинфекционный иммунитет мало изучен.

1.7. Маркеры кишечного воспаления при заболеваниях кишечника

В современной гастроэнтерологии одной из самых сложных проблем остаётся лечение НЯК и БК (Белоусова, 1998). Для обнаружения этих заболеваний используются эндоскопические, рентгенологические и морфологические методы исследования. Однако, они имеют много недостатков: инвазивность, лучевую нагрузку, введение в организм контрастных вещества, имеется множество противопоказаний.

Течение заболеваний происходит со сменами периодов ремиссии и рецидивов. Обострения при ВЗК часто разные, а симптомы заболевания не всегда возникают в одно время с началом обострения. Как правило, пациенты обращаются в медицинские учреждения за помощью не в момент начала болезни, это в дальнейшем приводит к более интенсивному и длительному лечению до наступления ремиссии. Возможность точно предугадывать начало обострения позволила бы оптимизировать терапию, снизить денежные траты на медикаменты и снизить оказываемый вред поддерживающей терапии тем, чей риск наступления обострения ниже.

На сегодняшний день «золотым стандартом» оценки активности воспалительных заболеваний кишечника считается эндоскопическое исследование с биопсией слизистой оболочки толстой кишки, позволяющая видеть воочию желудочно-кишечный тракт и получить материал для последующего гистологического исследования. Однако, данная методика инвазивна, не дает возможности исследовать весь желудочно-кишечный тракт по всей длине и требует специальной подготовки специалиста. Усовершенствование эндоскопических методик привело к появлению

видеокапсульной эндоскопии, за счет которой есть возможность визуального исследования даже самых глубоких отделов кишечника, которые, как правило, недоступны для обычных эндоскопических методов. Тем не менее, данный способ имеет высокую стоимость и считается недоступным, а также отсутствует возможность получения образцов ткани для гистологического анализа. Именно инвазивный характер этих методов считается препятствием для проведения диагностических процедур в каждом случае, когда это необходимо для оценки активности заболевания.

В последнее время возник острый вопрос о проблеме поиска действенного, не инвазивного и недорогого маркера активности кишечного воспаления, который можно было бы использовать в повседневной клинической практике, особенно актуальна данная проблема для педиатрии.

1.8. Лабораторные методы исследования

В зависимости от места течения патологического процесса и вида кампилобактериоза материалом для исследования может служить кровь, спинномозговая жидкость, фекалии и рвотные массы. *Campylobacter spp.* плохо переносят транспортировку. Для транспортировки собранного материала для исследования в бактериологическую лабораторию используют транспортную питательную среду Cary-Blair, а также среду для контроля стерильности с pH 8,5 или щелочную пептонную воду.

Как правило, изготавливают мазки из полученного материала, а затем окрашивают по Граму. При наличии в пробе кампилобактеров в мазке наблюдают грамотрицательные тонкие, спирально изогнутые палочки S- и C-образной формы длиной 0,5-8,0 мкм, которые часто соединяются в короткие цепочки в виде «крыльев летящей чайки». Для быстрого обнаружения кишечного кампилобактериоза тонкий мазок фекалий фиксируют над пламенем горелки 15 секунд, затем окрашивают водным раствором основного фуксина и промывают водой. Так как за такое короткое время

большая часть присутствующая в мазке сопутствующей микрофлоры прокраситься не успевает, кампилобактерии можно легко идентифицировать по особенностям строения.

Бактерии рода *Campylobacter* растут при концентрации кислорода в газовой среде от 5 до 17%. Сеют исследуемый материал на плотную питательную среду, приготовленную на основе эритрит-агара, в которую затем по мере остывания до 45-50°C добавляют 5% гемолизированной крови барана и реагенты для повышения аэротолерантности микроорганизмов (пируват натрия, сульфат железа и метабисульфит натрия).

Для очистки от ненужной микрофлоры используют два метода. Первый метод заключается в добавлении к питательной среде смеси антимикробных препаратов (полимиксин, рифамапицин, амфотерицин В, ристомнцин и фузидин), который даёт возможность выделять возбудитель из ассоциации микроорганизмов. Второй способ основан на способности кампилобактерий проходить сквозь поры размером 0,5-0,6 мкм, за счет задержки других микроорганизмов на мембране. Стерильные мембранные фильтры помещают на поверхность шоколадного или кровяного агара и наносят на них несколько капель 10% суспензии исследуемого материала. Спустя 30 мин фильтры убирают, чашки с посевами помещают в анаэроостат или эксикатор и проводят культивирование при температуре 42°C.

Для создания условий с низким содержанием кислорода понадобится: 5% кислорода, 10% двуокиси углерода и 85% азота. В случае отсутствия такой газовой смеси можно использовать «сосуд со свечой». Иногда используют газогенерирующие пакеты, принцип действия которых основан на каталитическом поглощении кислорода в замкнутом пространстве (анаэроостате и др.) до концентрации 5-7% и генерации двуокиси углерода химическим способом.

После 2-4 суток инкубации, на плотных питательных средах вырастают колонии двух типов. На свежих питательных средах вырастут колонии плоские, влажные, блестящие, с тенденцией к ползучему росту,

напоминающие растекающиеся капли конденсата. Если снизить влажность питательных сред в процессе хранения на плотных средах вырастут колонии второго типа: более плотные, выпуклые, полупрозрачные, негемолитические, диаметром 1-2 мм, трудно отличимые от колоний, контаминирующей микрофлоры. При наличии достаточного количества чистой культуры возбудителя готовят мазки и окрашивают их по Граму, определяют подвижность микроорганизмов методом «раздавленной» капли, ставят тесты на каталазу, оксидазу, гидролиз гиппурата натрия и определяют чувствительность к налidikсовой кислоте. При наличии небольшого количества колоний кампилобактеров изолированную колонию с характерными культуральными свойствами пересевают для накопления на плотную питательную среду и выращивают в микроаэрофильных условиях в течение 48 ч.

После получения чистой культуры возбудителя ставят указанные выше тесты и производят окончательную идентификацию выделенных микроорганизмов

Антигенная структура кампилобактерий сложная, особенно состав термолабильных антигенов (Аг). Важнейшие поверхностные Аг представлены липополисахаридами (О-Аг) и кислоторастворимыми белковыми фракциями, играющими ведущую роль в серотипировании. Общий Аг энтеробактерий отсутствует. Идентифицирован жгутиковый Н-Аг. В ответ на эти Аг кампилобактеров антитела появляются в крови в ранние сроки (на 5-е сут. заболевания титр антител достигает 1:5000) и сохраняются в ней длительное время после заболевания.

Серологический метод исследования играет огромную роль особенно при масштабных эпидемиологических исследованиях. Для диагностики отдельных случаев заболевания роль серологических методов исследования небольшая. РА ставится с аутоштаммами или живой музейной культурой, самые точные результаты получают с формализированной культурой. Значимый титр в РА - 1:8-1:32 появляется на 2-ой неделе. РСК

видоспецифична, она требует применения специального видового антигена. Наиболее чувствительными являются РИФ и ИФМ, эти системы разработаны за рубежом, а в РФ-экспериментальные партии для РНГА.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Клиническое и лабораторное обследование больных

В соответствии с целью исследования клинико-лабораторный отбор больных проводился из числа госпитализированных в ГБУЗ РБ «Инфекционная клиническая больница № 6» (ГБУЗ РБ ИКБ № 6) в 2016 году. Клинические образцы были собраны у 50 пациентов больных среднетяжелыми формами острой кишечной инфекции. Во всех случаях ОКИ протекала в виде осмотического типа диареи, по типу гастроэнтерита. Больные поступали в стационар в первые несколько дней с момента появления первых симптомов, разной степени тяжести. Основными симптомами являлись вялость, слабость, боли и неприятные ощущения в животе, отсутствие аппетита, общее недомогание и нестабильные, чаще жидкий стул.

Так же отбор проводился из числа госпитализированных в ГБУЗ РБ «Городская клиническая больница» № 21 в 2017 году. Клинические образцы были собраны у 6 пациентов с неспецифическим язвенным колитом (НЯК) и болезнью Крона. Больные поступали с сильно выраженными симптомами (стул с кровью и слизью, боль в нижней части живота, вздутие, потеря веса).

Для постановки диагноза использовались клинические, бактериоскопические и иммунологические методы.

2.2. Выделение бактериальной ДНК

Тотальную бактериальную ДНК выделяли из замороженного кала, используя стандартные наборы для выделения ДНК («Рибо-сорб», Россия). Данный метод основан на сорбции ДНК на частичках силикогеля (SiO_2) в присутствии 4-6 М гуанидинтиоционата. Лизирующим агентом в данном случае служит Triton X100, содержащийся в лизирующем буфере в

концентрации 0,5-1%. В свою очередь гуанидинтиоционат 4-6 М концентрации за счет своих хаотропных свойств также способствует лизированию клеток. В дальнейшем при добавлении суспензии силикогеля на их частицах происходит сорбция нуклеиновых кислот (НК). При центрифугировании комплекс $\text{SiO}_2 + \text{НК}$ уходит в осадок, а надосадочную жидкость, содержащую все остальные компоненты клеток, становится возможным удалить. Для избавления от остатка гуанидинтиоционата осадок промывали 70% этиловым спиртом в присутствии, которого комплекс $\text{SiO}_2 + \text{НК}$ не разрушается и при центрифугировании также уходит в осадок. Надосадочная жидкость также удаляется. При добавлении к комплексу воды, НК переходят в растворимую форму, тем самым освобождаясь от частичек силикогеля. Для лучшего перехода НК в раствор суспензию комплекса в воде прогревали до 65°C.

Клинический материал – фекалии. Образцов – 56. Из них:

Первый поток – 50 образцов (ОКИ)

Второй поток – 6 образцов (с диагнозом неспецифический язвенный колит и болезнью Крона)

Ход работы:

1. Взять необходимое количество одноразовых пробирок по типу эппендорф.
2. Добавить в каждую по 1 мл физраствора (0,9% NaCl).
3. Далее промаркировать пробирки.
4. В пробирки с физраствором вносить кал 1 грамм, жидкий – 200 мкл.
5. Затем тщательно ресуспендировать на вортексе и центрифугировать 15 мин при 12 тыс. об/мин.
6. Отдельным наконечником взять бактериальную фракцию в объеме 200 мкл, перенося её в новую пробирку.

7. Затем в каждую пробирку внести по 300 мкл лизирующего раствора (5М гуанидинтиоционат, 1% Triton X100). Хорошо перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при температуре 65°C.

8. Центрифугировать 5 сек при 5 тыс. об/мин на микроцентрифуге. Когда проба растворялась не полностью, пробирку центрифугировали на микроцентрифуге 5 мин при 12 тыс. об/мин и использовали для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенесли ее в новую пробирку.

9. В каждую пробирку новым наконечником внести по 25 мкл хорошо перемешанного сорбента (силикагель) и ресуспендировать на вортексе.

10. Затем пробирки оставить в штативе на пару минут, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.

11. Отцентрифугировать сорбент при 5 тыс. об/мин в течение 30 секунд.

12. Затем убрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

13. Добавить по 300 мкл раствора для отмывки (5М гуанидинтиоционат), хорошо перемешать.

14. Сорбент осадить центрифугированием при 5 тыс. об/мин на пол минуты.

15. Надосадочную жидкость удалить, а затем внести в неё по 950 мкл раствора для отмывки (70% этиловый спирт).

16. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировать 30 сек при 10 тыс. об/мин на микроцентрифуге.

17. Надосадочную жидкость.

18. Затем поместить пробирки в термостат на 8 минут при 65°C для подсушивания сорбента, открыв крышки пробирок.

19. Затем внести в пробирки по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК и перемешать на вортексе.

20. Поставить пробирки в термостат при 65°C на 5 мин, периодически встряхивая.

21. А затем центрифугировать пробирки при 12 тыс. об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге.

Очищенная ДНК находится в надосадочной жидкости. Пробы можно подвергать амплификации.

2.3. Подбор родоспецифичных праймеров

Для подбора праймеров использовали последовательности нуклеотидов 16S РНК генов, опубликованные в GenBank.

Поиск гомологичных генов производился с помощью программ MegAlign пакета Lasergene (DNASTAR, США) и программы MegaBlast доступной через сайт <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Для идентификации видового состава бактерий методом ПЦР были выбраны консервативные участки ДНК, которые кодируют 16S РНК. Эти гены считаются самыми удобными для подбора праймеров и для амплификации. Так как гены 16S РНК представлены в виде нескольких копий и их последовательности для большинства видов кампилобактерий секвенированы и доступны через GenBank. Однако последовательности этих генов для разных представителей кампилобактерий отличается всего на несколько нуклеотидов, что вызвало дополнительные сложности при подборе оптимальных и отличающихся друг от друга праймеров для ПЦР. В GenBank обнаружилось огромное количество нуклеотидных последовательностей различных кампилобактерий, из которых были взяты только те, которые получены из надежных источников и относятся к клинически важным видам. Последовательности генов 16S РНК этих сначала выравнивали при помощи программы MegAlign, это помогло определить все вариабельные участки ДНК, которые могли бы пригодиться для подбора праймеров. Эти участки нами были выделены и использованы в дальнейшем для подбора

перспективных для типирования праймеров. Подбор праймеров осуществляли при помощи программы PrimerSelect.

2.4. Амплификация участков ДНК методом полимеразной цепной реакции

В основе метода ПЦР (полимеразной цепной реакции) лежит возможность ферментов, таких как ДНК-полимераза, осуществлять направленный синтез соответствующей (комплементарной) цепи ДНК, по данной матрице одноцепочечной ДНК, наращивая маленькую олигонуклеотидную затравку (праймер), комплементарную участку этой матрицы, до размеров в несколько тысяч или даже десятков тысяч звеньев. Каждый цикл ПЦР состоит включает в себя три этапа. На первом этапе происходит денатурация ДНК, имеющаяся в образце. Для этого реакционную смесь нагревают до 92-95°C, в следствие этого двухцепочечные молекулы ДНК раздваиваются на одноцепочечные молекулы. На втором этапе происходит отжиг (присоединение праймеров к ДНК-мишени с образованием коротких двухцепочечных участков ДНК, необходимых для инициации синтеза ДНК). С вновь образованными комплексами праймер и матрица связывается ДНК-полимераза и на третьем этапе происходит одновременное копирование ДНК с двух праймеров комплементарных участкам ДНК на противоположных цепях и расположенных таким образом, что полимеризация ДНК с одного праймера приводила к синтезу цепи ДНК, в которой на определенном удалении содержался участок ДНК, комплементарный другому праймеру. Двунитевые фрагменты ДНК, равные по длине расстоянию между двумя праймерами, начинают накапливаться после третьего цикла. Образованные в первом цикле цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование нужного специфического фрагмента ДНК

генома вируса, бактерий или человека. Далее в амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза последующих цепей.

Основные компоненты реакционной среды:

1. ДНК-матрица - выделенная ДНК анализируемого образца, содержащая искомый специфический фрагмент.
2. Праймеры (Forward и Reverse) - синтетические олигонуклеотиды размером 15-30 пар нуклеотидов, комплементарные прямой и обратной цепям определяемого фрагмента и ограничивающие его; играют ключевую роль в образовании продуктов реакции и обеспечивают чувствительность и специфичность реакции. Для ПЦР используют 2 праймера, которые ограничивают с двух сторон последовательность.
3. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) - смесь четырех нуклеотидных оснований, «строительных блоков» для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.
4. Taq-полимераза - термостабильный фермент, катализирующий удлинение новой цепи ДНК.
5. Буферный раствор - реакционная среда, содержащая различные ионы, в том числе ионы Mg^{2+} , необходимые для поддержания оптимальной активности и стабильности фермента.

Амплификацию участков ДНК осуществляют с использованием стандартных наборов на амплификаторе «Терцик МС-2».

Можно использовать одновременно несколько пар родоспецифичных праймеров в одной реакционной смеси для одновременной амплификации ДНК различных микроорганизмов. Такая модификация называется множественной ПЦР (multiplex PCR). Множественная ПЦР может быть использована для выявления этиологической роли различных микроорганизмов, вызывающих заболевания определенного типа.

Ход работы:

1. Располагаем в штативе буфер Taq-полимеразы, дНТФ, растворы праймеров для разморозки, после ресуспендируем на вортексе. Taq-полимеразу хранят в холодильнике.
2. Отбираем нужное количество одноразовых пробирок объемом 0.6 мл, маркируем и расставляем в штатив.
3. Готовим амплификационную смесь для анализируемых проб в пробирке на 1.5 мл и разливаем по 22 мкл в каждую пробирку для амплификации на 0.6 мл.
4. В каждую пробирку вносим по 3 мкл ДНК исследуемого образца.
5. На поверхность каждой реакционной смеси наносим 1 каплю минерального масла во избежание испарения жидкости.
6. Пробирки закрываем, центрифугируем 5 с при 3000 об/мин на микроцентрифуге-вортекс.
7. Переносим пробирки в амплификатор.
8. На ДНК амплификаторе запускаем программу.
9. Проводим амплификацию на термоциклере «Терцик МС-2» («ДНК-технология», Россия).

Этапы проведения амплификации.

Для получения достаточного для визуализации количества копий целевого фрагмента ДНК необходимо провести 20-40 циклов амплификации, каждый цикл включает в себя несколько стадий:

Инициация - необходима в случае, если активация ДНК-полимеразы происходит с помощью нагревания при высоких температурах, реакционную смесь выдерживают при 93-96°C в течение нескольких минут.

Этап 1. Денатурация - реакционную смесь нагревают при 93-95°C в течение 30-40 сек., происходит расплетение двойной спирали ДНК с образованием одноцепочечных молекул.

Этап 2. Отжиг праймеров - происходит комплементарное связывание праймеров с ДНК-матрицей, температура отжига специфична для каждой

пары праймеров и ее значения располагаются в интервале 50-65° С, реакция протекает в течение 10-40 сек.

Этап 3. Элонгация цепи - происходит синтез новых цепей ДНК Taq-полимеразой путем удлинения праймеров в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Как правило, реакция протекает при 68-72°С, время проведения элонгации зависит от размера амплифицируемого фрагмента.

Образовавшиеся в ходе первого цикла амплификации новые молекулы ДНК служат матрицей для второго цикла репликации ДНК, таким образом, происходит экспоненциальное накопление целевых фрагментов ДНК (ампликонов) в реакционной смеси. За 30-40 циклов амплификации в растворе накапливается около 10⁸ молекул ампликона. Такого количества достаточно для визуального обнаружения ПЦР-продукта методом электрофореза в агарозном геле.

Программа амплификации:

- | | | |
|--------------------------------|---|-----------|
| 1. Денатурация – 95°С – 20 сек | } | 30 циклов |
| 2. Отжиг – 58°С – 20 сек | | |
| 3. Элонгация – 72°С – 30 сек | | |
| 4. Хранение – 10°С | | |

Для улучшения работы ферментов и уменьшения количества неспецифичных продуктов амплификации может быть использована ПЦР с «горячим стартом». В этой вариации Taq-полимераза, разбавленная в 10 мкл соответствующего 1-кратного буфера, попадает в реакционную смесь после прогревания до 94°С, это помогает избежать неспецифический отжиг праймеров на нуклеотидных последовательностях с низкой гомологией.

Качество и количество амплифицированных фрагментов ДНК определяли аналитическим электрофорезом в 1% агарозном геле. После окончания электрофореза гели окрашивали бромистым этидием и

фотографировали на фотодокументационной системе Gel Camera System (UVP, Inc. США).

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 (1,5-2 мин). Раствор остужали до 50°C. В заливочную камеру помещали чисто вымытую стеклянную пластинку. Края камеры обрабатывали остывающей агарозой во избежание дальнейшего вытекания агарозы из камеры. На одном из краев камеры установили пластиковый гребешок так, что его зубцы образовали в геле лунки для проб ДНК. Необходимо, чтобы между концом зубчиков и стеклянной пластинкой оставался зазор 0,3-0,5 см. Аккуратно заливали в форму теплый раствор агарозы толщиной не более 5-6 мм. После затвердения агарозы (15-20 мин) аккуратно вынимали гребенку, стараясь не повредить образовавшиеся кармашки. Пластинку с гелем из камеры помещали в электрофоретическую камеру. Заливали в камеру буфер так, что он покрыл агарозу сверху тонким слоем 2-3 мм.

Отбирали 10 мкл раствора ДНК из эппендорфа на пластинку для нанесения проб. Добавляли 3 мкл красителя бромфенолового синего с ксиленцианолом и глицерином. Перемешивали пипеткой. Медленно наносили автоматической пипеткой пробу ДНК с красителем в лунку геля под слой буфера. Подключали клеммы прибора к источнику питания так, чтобы (-) находился на старте, а (+) – на финише. Включали источник питания и устанавливали напряжение в 100 вольт. Проводили разделение ДНК в течение 20 мин. Вынимали пластинку с гелем и помещали ее в кювету для окрашивания. Наливали в кювету слабый раствор бромистого этидия. Окрашивали в течение 7-10 мин. Сливали краситель в колбу.

Промывали гель проточной водой. Помещали его на стекло трансиллюминатора. Фотографировали гель на фотосистеме Gel Camera System (UVP, Inc. США).

2.6. Высокотемпературная демаскировка биоптатов (1 способ)

Были получены фиксированные в парафине различные участки толстого кишечника, взятые после смерти пациента с диагнозом НЯК. Для выделения ДНК необходимо было депарафинизировать клинический материал.

Существуют определенные особенности процесса демаскирования. Для этого могут быть использованы водные растворы солей различных металлов и буферные растворы при различных pH. Предполагается, что помимо гидролиза межмолекулярных связей, которые образуются после действия различных фиксаторов, эффективность теплового демаскирования зависит от качества удаления из срезов ионов Ca^{2+} . Этого можно добиться добавлением в буферные растворы солей лимонной кислоты или этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, Трилон Б).

Высокотемпературная демаскировка антигенов требует нагрева срезов в буферных растворах до температуры почти 100°C , а кипение раствора отрицательно сказывается на сохранности срезов, были исследованы возможности применения различных приборов для получения высокой температуры без кипения буфера. Выяснилось, что для этих целей можно применять водяную баню ($95 - 98^{\circ}\text{C}$), микроволновую печь, пароварку, автоклав, скороварку. В последних двух случаях можно достичь температур выше 100°C благодаря нагреванию при повышенном давлении. Чем выше температура, тем быстрее процесс демаскировки.

Заранее готовили фосфатный буфер. Перед проведением демаскировки срезы помещали в термостат при 37°C на ночь. При помощи медицинского скальпеля удаляли излишки парафина, помещали оставшиеся

кусочки в пробирки типа эппендорф и оставляли на час при 57 °С на нагревательном столике. Расплавленные срезы освобождали от расплавленного парафина и помещали в ксилол на 10 минут, по истечении времени меняли раствор на свежий и помещали еще на 10 минут. Затем производили нагрев до 96 градусов в 96% спирте 3 раза по 3 минуты. Помещали в дистиллированную воду 3 раза по 2 минуты, меняя каждый раз воду на новую.

Затем следовал этап демаскировки, для этого помещали кусочки на 30 минут в фирменный буфер TRIS\HCL pH = 6,0. После, в микроволновую печь на 3 минуты на режим *max* и еще на 20 минут в режим «разморозка». По прошествии времени происходит остывание в течение 20 минут при комнатной температуре. Два раза ополаскиваем дистиллированной водой и затем помещаем в свежую дистиллированную воду 2 раза по 3 минуты. Готовили TRIS для промывки, для этого смешивали 4 мл буфера и 396 мл дистиллированной воды, выдерживали срезы по 3 минуты 2 раза.

После демаскировки следовал этап заморозки при -70°С в течение часа. Затем ткань перетирали в керамической ступке и помещали в пробирки на 1,5 мл в физраствор (NaCl 0,9 %). После этого образцы готовы к выделению ДНК.

2.7. Выделение ДНК из биоптатов

Комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала, продуктов питания и кормов для животных "ДНК-сорб-С" предназначен для выделения: тотальной ДНК из микробиоптатов кожи и слизистых оболочек (мочеполовой системы, ЖКТ, бронхов) и паренхиматозных органов (пунктаты печени, селезенки), а также из гомогенизированных тканей. Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 биоптатов размером 10-25 мм³ (мкл); ДНК из пищевых продуктов, биологических добавок, кормов для животных или растительного сырья.

Прогревали буфер для лизирующего реагента и раствор для отмывки 1, если они хранились при температуре от 2 до 8 °C, при температуре 64 °C до полного растворения кристаллов. Отобирали необходимое количество одноразовых полипропиленовых пробирок объемом 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли).

В ходе работы носили в каждую пробирку по 10 мкл ВКО. Добавляли в пробирки по 400 мкл буфера для лизирующего реагента и по 17 мкл лизирующего реагента. Вносили в приготовленные пробирки по 100 мкл исследуемых образцов, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции вносили 100 мкл ОКО, в пробирку положительного контроля (ПК) экстракции вносили 90 мкл. Плотнo закрыв крышки, тщательно перемешали и осадили капли на вортeксе. Помещали пробирки в термостат с температурой 64 °C на 1 ч, периодически перемешивая на вортeксе (5 раз через каждые 10–12 мин).

Затем осаждали нерастворенные частицы образцов центрифугированием в течение 5 мин при 10 тыс. об/мин. Отбирали надосадочную жидкость в объеме 200–350 мкл очень аккуратно (избегая попадания взвешенных частиц) отдельными наконечниками с фильтрами и переносили в новые пробирки. Осаждали капли на вортeксе. Затем ресуспендировали сорбент универсальный, интенсивно перемешивая на вортeксе. Добавив в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального, плотно закрыв крышки, перемешивали на вортeксе и оставляли в штативе на 10 мин, перемешивая через каждые 2 мин. После, центрифугировали пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 5 тыс. об/мин.

Не захватывая сорбент, удаляли надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Добавляли в пробирки по 300 мкл раствора для

отмывки 1, плотно закрыв крышки, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 5 тыс. об/мин. Не захватывая сорбент, удаляли надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Затем добавляли в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 2, плотно закрыв крышки, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 10 тыс. об/мин. Не захватывая сорбент, удаляли надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Повторяли процедуру отмывки, удаляя надосадочную жидкость полностью. Помещали пробирки с открытыми крышками в термостат с температурой 64 °C на 10-20 мин для подсушивания сорбента универсального и, затем, добавляли в пробирки по 50–100 мкл буфера для элюции В. Перемешав на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, помещали в термостат с температурой 64 °C на 5–10 мин, периодически (1 раз в минуту) перемешивая на вортексе. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 14 тыс. об/мин.

Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР. Для этого, не захватывая сорбент, переносили надосадочную жидкость в новую пробирку и хранили в морозильной камере.

2.8. Депарафинизация и оптимизация метода выделения ДНК из ткани, фиксированной в формалине и заключенной в парафин (2 способ)

2-ой способ основан на быстром лизисе тканей, избавлении от парафина и осаждении ДНК этанолом. Преимуществами данного метода

являются отсутствие органических растворителей и в несколько раз более низкая стоимость (Писарева и др., 2015).

Общая схема состоит из трех этапов:

- 1) Лизис ТПФ в растворе щелочи в присутствии детергента в течение 30 мин при температуре 95°C;
- 2) Депарафинизация методом вымораживания;
- 3) Осаждение ДНК этанолом.

Заранее готовили 1 М раствор ацетата натрия. Для этого взвешивали 20,4 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ и доводи дистиллированной водой до 50 мл.

На этапе лизиса готовили срезы толщиной 5 мкм, помещали их в 1,5-миллилитровые пробирки типа эппендорф по 4 среза и лизировали ткань в 200 мкл раствора 0,1 М NaOH-0,5 % SDS при 95°C в течение 30 мин. Затем нейтрализовали смесь добавлением 3 М ацетата натрия с pH=5,0 до конечной концентрации 0,3 М.

Для депарафинизации вымораживанием образцы после лизиса охлаждали 5 минут при температуре -20°C для застывания парафина. Жидкий лизат из-под слоя застывшего парафина переносили в новую пробирку и использовали для последующего выделения ДНК.

ДНК очищали спиртовым осаждением, для этого к раствору ДНК после лизиса добавляли два объема изопропанола, центрифугировали 2 мин при 5 тыс. об/мин для осаждения остатков парафина. Супернатант переносили в новую пробирку и осаждали ДНК центрифугированием 5 мин при 10 тыс. об/мин. Далее изопропанол удаляли фильтровальной бумагой со стенок пробирки, а осадок промывали 1 мл 96% этанола и растворяли в 100 мкл воды.

2.9. Амплификация участков ДНК методом полимеразной цепной реакции с помощью подобранных праймеров

Для аналитической ПЦР использовался объем реакционной смеси 25 мкл. В этом случае реакционная смесь объемом 30 мкл содержала 1 мкл геномной ДНК (100 нг/мкл), 3 мкл 10-кратного буфера для Taq - полимеразы, поставляемого в наборе с используемым ферментом, по 3 мкл dNTP, 1мкл каждого праймера и 1 мкл Taq-полимеразы. Во избежание испарения жидкости на поверхность каждой реакционной смеси наслаивали 50 мкл минерального масла. ПЦР проводилась в амплификаторе МС-16 «Терцик» («ДНК-технология», Россия). На начальном этапе проводилась денатурация ДНК при 94°C, после чего следовали 25-30 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию детанурации ДНК в течение 40 сек при 94°C, стадию отжига праймеров продолжительностью 1 мин 30 сек при температуре 52°C (600 п.н. длина праймеров на *Campylobacter*), и стадию элонгации в течение 1 мин 30 сек при температуре 72°C, оптимальной для Taq-полимеразы.

Качество и количество амплифицированных фрагментов ДНК определяли аналитическим электрофорезом в 1% агарозном геле. После окончания электрофореза гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали на фотодокументационной системе Gel Camera System (UVP, Inc. США).

В исследуемых образцах искомой ДНК обнаружено не было, в следствие этого был найден новый, улучшенный протокол выделения ДНК материала ТПФ.

2.10. Проведение ПЦР в режиме реального времени

Для постановки ПЦР в режиме реального времени использовали пару родоспецифичных праймеров к фрагментам ДНК исследуемых

микроорганизмов и 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I (ООО «СИНТОЛ», согласно инструкции производителя). ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора CFX96 Touch "REAL TIME" (Bio-Rad, США).

Для постановки ПЦР в режиме реального была взята пара родоспецифичных праймеров к фрагментам ДНК исследуемых микроорганизмов и 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I (ООО «СИНТОЛ», согласно инструкции производителя). ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора CFX96 Touch "REAL TIME" (Bio-Rad, США).

Ход работы:

1. Подготовили и расставили в штативе пробирки с тотальной ДНК, 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I, mQ, растворы праймеров для разморозки; ресуспендировать на вортексе.
2. Отобрали пинцетом нужное количество одноразовых стерильных пробирок объемом 0,2 мл и расставили в штатив соответствующим образом.
3. В подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки, внесли в них по 9 мкл mQ, после чего внесли по 10 мкл 2,5х-ной реакционной смеси, используя наконечники без фильтра.
4. Добавили в каждую пробирку по 1 мкл растворов праймеров, предварительно разведенных до 2 о.е.
5. В каждую пробирку внесли по 3 мкл ДНК исследуемого образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром.
6. Пробирки плотно закрыли, перемешали содержимое встряхиванием, затем перенесли пробирки в амплификатор и расставили соответствующим образом.
7. На приборе создавали эксперимент с соответствующими параметрами плашки: размер, тип, режим сканирования, флуорофор, названия проб; указать объем реакционной смеси в одной пробирке. Затем запускали программу со следующими параметрами:

	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95 °C	5 мин	1
Денатурация	95 °C	10 сек	38
Отжиг	58 C/55 C	25 сек	
Элонгация	72 °C	30 сек	
Достраивание цепей ДНК	72 °C	30 сек	1

По окончании амплификации по показателю индикаторного цикла рассчитывали относительное количество ДНК исследуемого инфекционного агента.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Подбор праймеров для ПЦР-идентификации

Campylobacter spp.

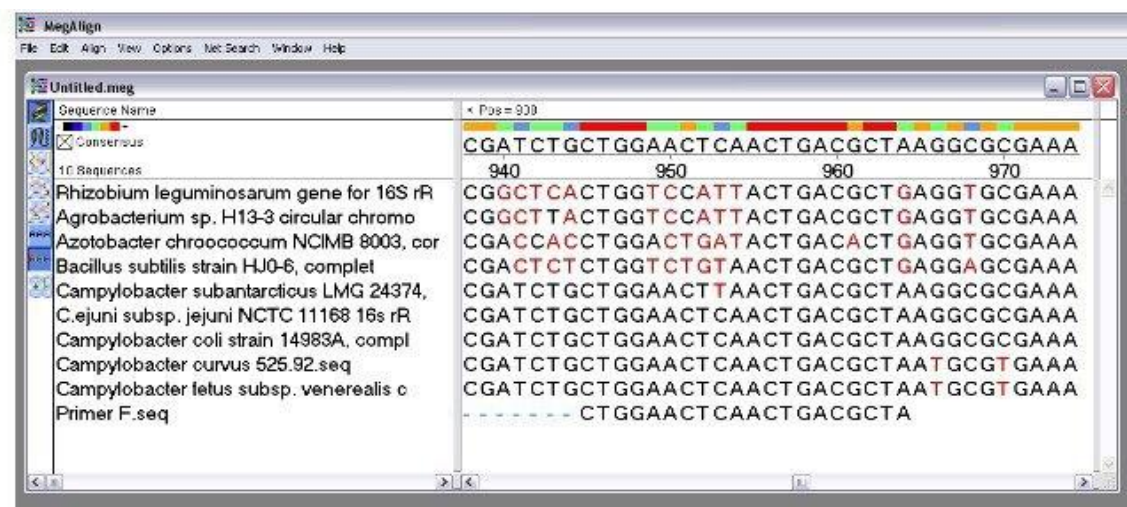
Для подбора праймеров был использован ресурс GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), проводили поиск сходных последовательностей по всей базе данных генов с помощью программы PrimerSelect из пакета программ фирмы DNASTar («DNASTAR, Inc.», США). Окончательно определившись с нуклеотидными последовательностями, приступили к подбору оптимальных для ПЦР-диагностики праймеров. Использовали такие критерии отбора праймеров, как полное отсутствие димеров и шпилек праймеров, длина амплифицируемого участка от 200 п.н. до 1000 п.н., температура отжига более 53⁰С. А также для подбора пары олигонуклеотидных праймеров, использовались следующие требования:

- оптимальные праймеры не должны образовывать между собой стабильные димеры и не должны формировать шпилечные структуры;
- желательно, чтобы температура отжига была больше 55⁰С, но меньше 70⁰С;
- 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.

В результате проделанной работы были подобраны праймеры для амплификации *Campylobacter spp.*: CampF CTGGAAC TCAACTGACGCTA (рис.1) и CampR CTGGAAC TCAACTGACGCTA (рис.2). Здесь расчетная температура отжига составила 58⁰С, а размер ампликона 600 п.н. (табл.1).

Таблица 1. Праймеры, используемые в работе, и их характеристика

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймеров	Тем. отжига	Ожид. размер продукта (пн)
CampF	5' – CTGGAAC TCAACTGACGCTA-3'	58°C	600
CampR	5' – CTGGAAC TCAACTGACGCTA-3'		

Рисунок 1 – Прямой родоспецифичный праймер для амплификации бактерий *Campylobacter spp.*Рисунок 2 – Обратный родоспецифичный праймер для амплификации бактерий *Campylobacter spp.*

3.2. Проверка специфичности праймеров на *Campylobacter* spp.

Важнейшей характеристикой праймеров, используемых для клинической идентификации ДНК микроорганизмов-возбудителей тех или иных заболеваний, является их специфичность. Поскольку мы не имели в наличии чистую культуру *Campylobacter* spp., соответственно не могли с уверенностью сказать, что подобранные праймеры действительно родоспецифичны, но могли проверить не отжигаются ли подобранные праймеры к ДНК других бактерий. Для этого использовали ДНК, выделенные из чистых культур различных видов микроорганизмов: *E. coli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Pseudomonas*. В результате подобранные праймеры не сработали ни в одном образце. Таким образом, можно сказать, что подобранные нами праймеры обладают специфичностью и не будут показывать ложноположительный результат.

3.3. Анализ представленности патогенных *Campylobacter* в исследуемом клиническом материале

В качестве клинического материала были использованы фекалии больных. При этом выделяли тотальную ДНК из материала, объемом не больше 200 мкл. В связи с этим, необходимо отметить, что даже при наличии тех или иных микроорганизмов в клиническом материале, они могли быть не идентифицированы.

В исследуемых образцах кала бактерии рода *Campylobacter* обнаружены не были (рис.3), скорее всего, это связано с тем, что данные бактерии являются инвазивными и со стулом их выделяется в очень маленьких концентрациях. Следовательно, было решено выделить ДНК из биоптатов.

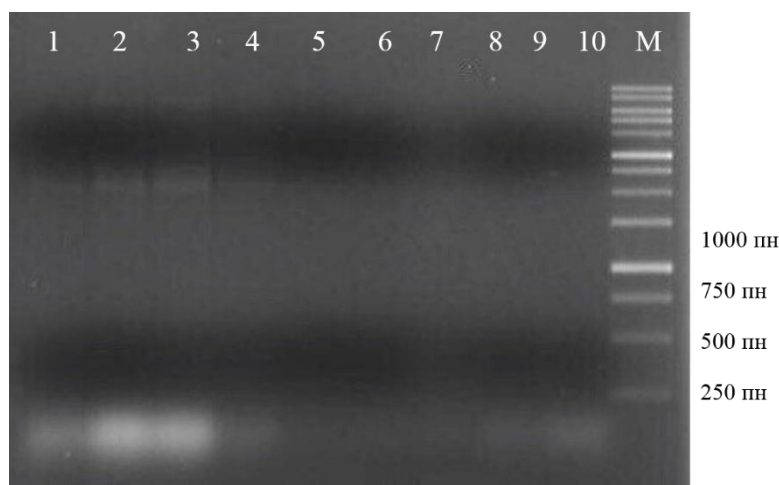


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК *Campylobacter spp.*: 1-9 – ДНК исследуемых образцов; 10 - отрицательный контроль

3.4. Выделение ДНК из биоптатов

Заключенные в парафин участки толстого кишечника были подвержены высокотемпературной демаскировке (1 способ), после чего следовал этап выделения ДНК и ПЦР-анализ продуктов амплификации. Метод оказался неэффективным и из 20 образцов биоптатов положительных не оказалось. Для подтверждения результата был поставлен ПЦР в режиме реального времени, где результаты также были отрицательными (рис.4). Было принято решение выбрать другой способ депарафинизации (2 способ).

Перед проведением демаскировки были приготовлены срезы биоптатов толщиной 5-7 мкм при помощи микротомы - инструмент для приготовления срезов фиксированной и не фиксированной биологической ткани, а также небиологических образцов для оптической микроскопии толщиной 1-50 мкм. Такие срезы способствуют более лёгкому отделению парафина от биологической ткани, а, значит, и более успешному проведению депарафинизации. Необходимые растворы были приготовлены нами по всем правилам, а затем проведена депарафинизация срезов 2 способом.

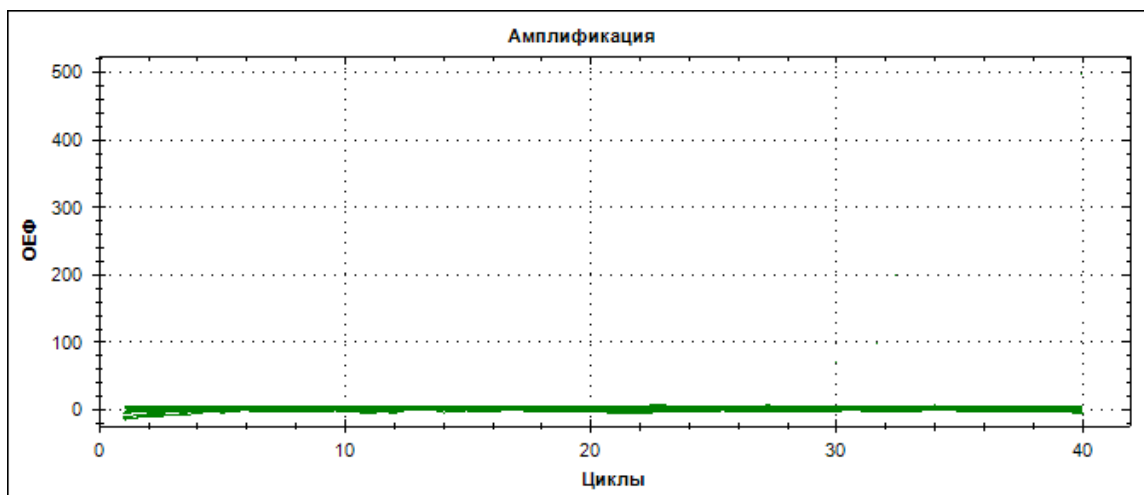


Рисунок 4 – Результаты амплификации ПЦР в режиме реального времени при выделении ДНК 1 способом

После очищения ДНК спиртовым осаждением приступали к проведению ПЦР-анализа.

3.5. Результаты ПЦР-анализа и ПЦР в режиме реального времени

Результаты классического ПЦР-анализа также были отрицательными. Для подтверждения результата был поставлен ПЦР в режиме реального времени, где были обнаружены бактерии рода *Campylobacter* (рис.5).

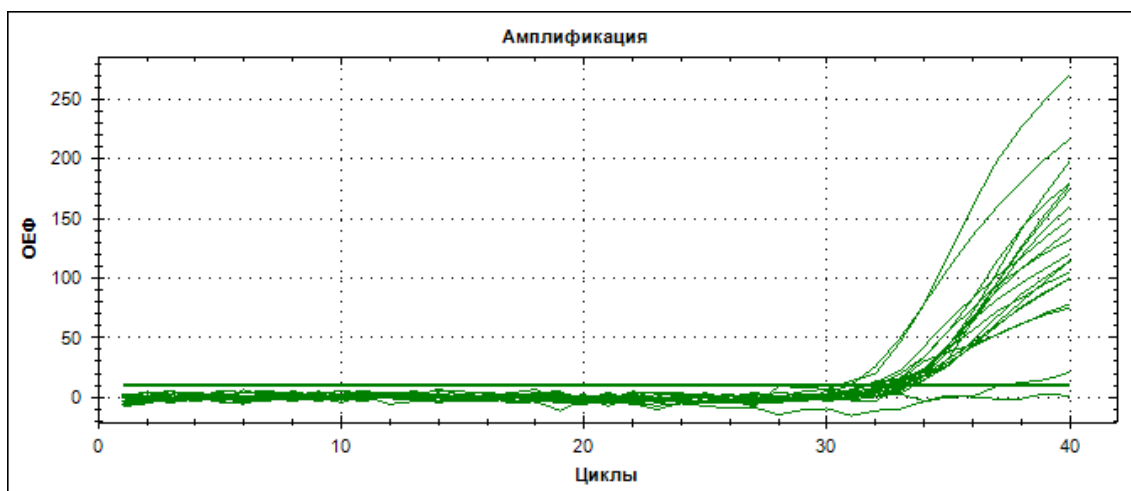


Рисунок 5 – Результаты амплификации ПЦР в режиме реального времени при выделении ДНК 2 способом (температура отжига 58°C)

Данный график показывает, что в депарафинизированных биоптатах была обнаружена ДНК *Campylobacter spp.* Все 20 исследуемых образцов были положительными.

Детекция ДНК начинается после 30-го цикла, что говорит либо о низкой концентрации ДНК в клинических образцах, либо о необходимости оптимизации условий для проведения ПЦР в режиме реального времени, либо же при выделении из парафинизированных биоптатов идет большая потеря ДНК на какой-либо стадии выделения ДНК.

Не смотря на различную концентрацию искомой ДНК, все образцы были положительными. Данный результат говорит о том, что подобранные нами олигонуклеотидные праймеры действительно являются специфичными к исследуемым микроорганизмам.

3.6. Оптимизация условий для проведения ПЦР в режиме реального времени

Температура отжига зависит от состава праймеров и чаще всего выбирается на 4-5°C ниже их температуры плавления. Неверный выбор температуры отжига приводит либо к связыванию в неправильном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре), либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо

Так как детекция ДНК начиналась лишь после 30-го цикла было решено попробовать снизить температуру отжига с 58°C до 55°C и сравнить пороговый цикл, тем самым оптимизировав работу праймеров. Для этого были взяты три положительных образца из предыдущего эксперимента (№ 4, 5, 6).

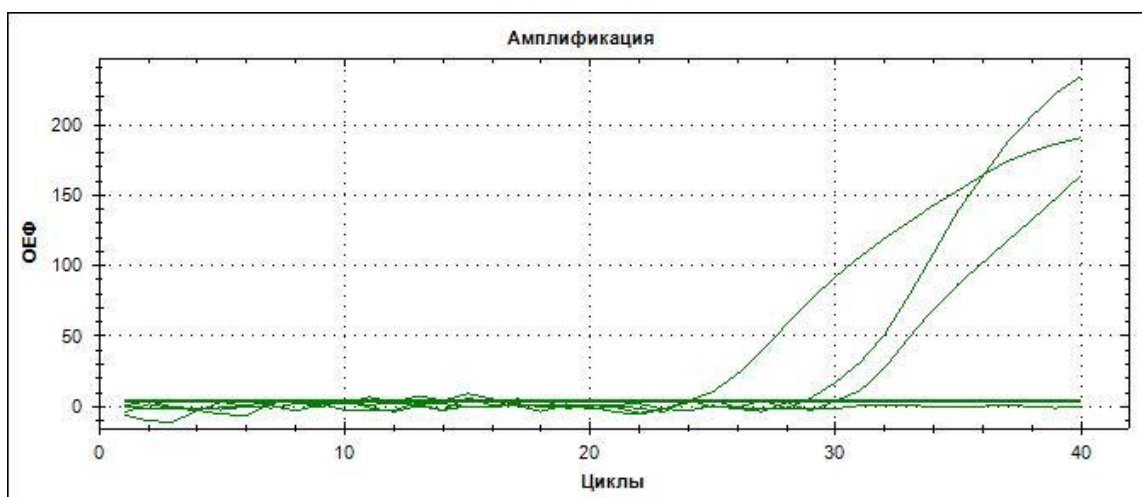


Рисунок 6 – Результаты амплификации ПЦР в режиме реального времени при выделении ДНК 2 способом (температура отжига 55°C)

В результате при температуре отжига 58°C пороговый цикл у образцов № 4, 5, 6 был равен 32,64; 31,90 и 32,59, соответственно. А при температуре 55°C 30,57; 29,18 и 24,64, соответственно, что свидетельствует об улучшении работы праймеров. Далее также были поставлены реакции с понижением температуры отжига до 50°C, но повышения качества ПЦР не выявлено. Ввиду этого, рекомендуемая температура отжига для пары праймеров CampF и CampR - 55°C.

Таким образом, предложенный нами подход позволит разработать оптимальный метод и наборы реагентов для пробоподготовки и ПЦР в режиме реального времени для обнаружения *Campylobacter spp.* непосредственно в биоптатах, получаемых для гистологического исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения данной работы были подобраны олигонуклеотидные праймеры к уникальным участкам ДНК для идентификации бактерий рода *Campylobacter*. Подобранные праймеры удалось апробировать и оптимизировать их работу за счёт снижения температуры отжига.

Методом ПЦР был проанализирован клинический материал (фекалии) 56-ти больных на наличие кампилобактерий и 20 биоптатов. При этом в клинических образцах, выделенных их фекалий ДНК бактерий рода *Campylobacter* не были обнаружены. Все исследуемые образцы биоптатов показали положительный результат при амплификации в режиме реального времени.

Для выделения ДНК из биоптатов были использованы 2 способа демаскировки. Первый способ – это высокотемпературная демаскировка биоптатов, в результате которой не была детектирована ДНК бактерий рода *Campylobacter*. Второй способ – депарафинизация и оптимизация метода выделения ДНК из ткани, фиксированной в формалине и заключенной в парафин дал результат. Все 20 исследуемых образцов были положительными при амплификации в режиме реального времени. Таким образом, второй использованный метод был наиболее подходящим для выделения ДНК из биоптатов и имел больше преимуществ перед предыдущим методом: быстрый лизис ткани, отсутствие органических растворителей и в несколько раз ниже стоимость, что позволяет рекомендовать его для широкой клинико-лабораторной практики.

Таким образом, созданы и испытаны на клиническом материале олигонуклеотидные праймеры, пригодные для создания диагностических системы для идентификации при помощи ПЦР в режиме реального времени микроорганизмов рода *Campylobacter*.

ВЫВОДЫ

1. В генах 16S рРНК *Campylobacter spp.* обнаружены консервативные, свойственные только данной группе микроорганизмов мотивы последовательностей ДНК, к которым могут быть подобраны родоспецифичные олигонуклеотидные праймеры.

2. Исследование ДНК, выделенной из фекалий, взятой у больных с диагнозом «острые кишечные инфекции» не позволяет обнаруживать бактерии рода *Campylobacter*, тогда как исследование биоптатов от пациентов с диагнозом «неспецифический язвенный колит» показало наличие ДНК во всех образцах.

3. Классическая ПЦР неэффективна в детекции бактерий рода *Campylobacter*, тогда как ПЦР в режиме реального времени с родоспецифичными праймерами обеспечивает обнаружение *Campylobacter spp.*, в том числе в биоптатах.

4. Для эффективной детекции *Campylobacter spp.* в биоптатах методом ПЦР в режиме реального времени необходимо изменение этапа выделения ДНК из ткани и включение специальной процедуры депарафинизации, фиксированных в формалине и заключенных в парафин блоков.

5. Результаты проделанной работы могут быть применимы в медицине, в практическом здравоохранении, в лабораторной диагностике для выявления данных микроорганизмов как для этиологической диагностики, так и для контроля эффективности лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров В.А. Основы иммунной системы желудочно-кишечного тракта. - Методическое пособие. - Санкт-Петербург: МАПО, 2006. - С. 44.
2. Беляков В. Д., Яфаев Р. Х. «Эпидемиология», 1989
3. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Никишина Н.М.; Ульяновский ГСА; Методы частной бактериологии: учебно-методическое пособие /. - С. 175 - 183. Ульяновск, 2006
4. Воробьев Г.И., Халиф И.Л. Неспецифические воспалительные заболевания кишечника. - М.: Миклош, 2008. - 400 с.
5. Григорьева Л.В., Корчак Г.И., Малахова Л.А. Использование красок для выявления факторов патогенности эшерихий и сальмонелл // Лаб. дело. - 1992. - № 2. - С. 57-59.
6. Дорофеев А.Э. Клинико-патогенетическая характеристика неспецифического язвенного колита с внекишечными поражениями и оптимизация его терапии: автореферат дис. д-ра. мед. наук.: 14.01.36 / А.Э. Дорофеев — Днепропетровск, 2004; 40.
7. Дорофеев А.Е., Швец О.В., Эпидемиология и факторы риска при воспалительных заболеваниях кишечника. 2014; (11):22-9.
8. Маев И. В., Черемушкин С. В. Синдром раздраженного кишечника: Учебное пособие. - М., ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2004.
9. Охапкин М.Б. Прогноз позднего гестоза и задержки роста плода по данным доплерометрии // Ультразвуковая диагностика в акушерстве, гинекологии и педиатрии. - 1993. - № 1. - С. 42-5.
10. Писарева Е. Е., Любченко Л. Н., Коваленко С. П., Шаманин В. А. Оптимизация метода выделения ДНК из ткани, фиксированной в формалине и заключенной в парафин. / Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. - 2015.

11. Полуэктова Е.А., Ляшенко О.С., Королев А.В. Механизмы, обеспечивающие взаимодействие бактериальных клеток с организмом хозяина, и их нарушение у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2014; 5: 42–53.
12. Радчука Н.А. Ветеринарная микробиология и иммунология. – М.: Агропромиздат, 1991. - 382 с.
13. Сичинский Л. А. Кампилобактериозы. Этиология и лабораторная диагностика / Л. А. Сичинский // Здравоохранение Молдавии. 1991. - №2. - С. 51-55.
14. Стрижаков А.Н. Информативность доплерометрии в прогнозировании возникновения гестозов и синдрома задержки развития плода // Акушерство и гинекология - 1990. - № 7. – С. 12–15.
15. Урсова Н.И. Дисбактериозы кишечника у детей. Руководство для практикующих врачей / Под ред. профессора Г.В. Римарчук. - М., 2006. - С. 240.
16. Чайка Н.А., Хазенсон Л.Б., Бутцлер Ж.П. Кампилобактериоз. - 1988.
17. Чайка Н.А. и др. // Современная медицина - 1981. - №10. - С. 64-69.
18. Шманов К.С. Некоторые биологические свойства *Campylobacter jejuni*: бюллетень Всесоюзного ордена Ленина / К.С. Шманов, И.П. Иренков// НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. М., 1984. - Вып. 56. -С. 36-39.
19. Щеплягина Л.А., Чернов В.М., Круглова И.В., Делягин В.М. Возрастные особенности иммунитета у детей. Лекция для врачей. — М., 2008. - С. 36.
20. Biancone L., Monteleone J., Del Vecchio Blanco G., et al. Resident bacterial flora and immune system // Dig Liver Dis., - 2002. - Sup. 2. - P. 37-43.

21. Blaser M.J., Hoverson D., Ely I.G., Duncan D.J., Wang W.L., and Brown W.R., 1984. Studies of *Campylobacter jejuni* in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 86, 33–38.
22. Dasti J. I., Tareena A. M., Lugerta R. Et al. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms // *Int. J. Med. Microbiol.* - 2009; doi: 10.1016 / j. ijmm. 2009.07.002.
23. Kaur N., Chen C.C., Luther J., Kao J.Y. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 2011; 2: 211-216.
24. Langan R.C., Gotsch P.B., Krafczyk M.A. et al. Ulcerative colitis: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 2007; 76(9):1323–30.
25. Moore J.E., Corcoran D., Dooley J.S.G., Fanning S., Lucey B., et al. (2005) *Campylobacter*. *Vet Res* 36: 351–382.
26. Podolsky D.K. (2002) Inflammatory bowel disease. *New Engl J Med.*
27. Rodriguez L. A., Ruigomez A. Increased risk of irritable bowel syndrome after bacterial gastro-enteritis: cohort study // *BMJ.* - 1999. - Vol. 318. - P. 565 - 566.
28. Tam C. C., Rodrigues L. C., O'Brien S. J. Guillain-Barre syndrome associated with *Campylobacter jejuni* infection in England, 2000–2001 // *Clin Infect Dis.* - 2003. - Vol. 37 (2). - P. 307-310.
29. Vandamme P., Dewhirst F.E., Paster B.J., On SLW (2005) Genus I. *Campylobacter*. In: Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed. New York: Springer. pp 1147-1160.
30. Wehkamp J., Schmid M., Stange E.F. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease // *Curr. Opin. Gastroenterology.* - 2007. - Vol. 23. - P. 370-378.
31. Weinstock G.M. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature* 2012; 489: 250-256.

32. Yuki N. Pathogenesis of Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis // Jpn J. Infect Dis. - 1999. - Vol. 52 (3) -P. 99-105.

33. Zoetendal E.G., Rajilic-Stojanovic M., de Vos W.M. Highthroughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. Gut 2008; 57: 1605-161.

ОТЗЫВ

научного руководителя на выпускную квалификационную (дипломную) работу студента 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. – «Биология» медико-профилактического факультета с отделением микробиологии **Бижбаловой Лины Олеговны** на тему «Молекулярно-генетическая конструкция для детекции бактерий рода *Campylobacter* в различных средах».

Дипломная работа Бижбаловой Л.О. посвящена созданию конструкции для детекции бактерий рода *Campylobacter* в различных средах. Работа выполнена с использованием теоретических основ микробиологии. Анализ данных исследования выполнен комплексно с применением освоенных практических навыков. Практическая часть работы выполнена самостоятельно. В работе были исследованы предоставленные клинические образцы, использованы методы: ПЦР-анализ, детекция ПЦР-продуктов методом агарозного гель-электрофореза, RT-ПЦР, демаскировка биоптатов.

Работа построена по традиционному, включает такие разделы, как введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследований, результаты и обсуждение, выводы, список цитируемой литературы, приложения. Во введении сформулированы цель и задачи исследования, подробно и точно изложены основные итоги проделанной работы.

За время выполнения выпускной квалификационной работы Бижбалова Л.О. зарекомендовала себя как работоспособный студент, имеющий хорошую теоретическую подготовку и ориентированную на саморазвитие.

Бижбалова Л.О. является победителем конкурса «У.М.Н.И.К.» (осень, 2016), соавтором 1 статьи в сборнике материалов 82-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа-2017) и тезиса в материалах Всероссийской научно-практической конференции «Инновации в медицинской, фармацевтической, ветеринарной и экологической микробиологии» (Санкт-Петербург-2017).

Работа выполнена и рекомендуется к защите.

Научный руководитель:
д.м.н., профессор


(подпись)

А.Р. Мавзютов

Научный консультант:
к.б.н.


(подпись)

Л.Р.Хакимова

«19» июня 2017 г.

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу обучающегося 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. Биология **Бижбаловой Лины Олеговны** на тему «Молекулярно-генетическая конструкция для детекции бактерий рода *Campylobacter* в различных средах».

Данное исследование является научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной проблемы, как теоретической и практической микробиологии, так и медицины. Автором был проанализирован большой объем теоретического материала, для написания проекта использованы научные труды отечественных и зарубежных авторов, проблема раскрыта всесторонне и с разных точек зрения. Подобранный материал изложен четко, последовательно, с соблюдением логики повествования.

Содержание данной дипломной работы соответствует первоначальному заданию. Проблематика раскрыта полно и всесторонне, цель достигнута, задачи решены, выводы правильны и обоснованы, выработанные рекомендации и предложения имеют большую практическую значимость.

Дипломная работа Бижбаловой Л.О. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к выпускной квалификационной работам, может быть допущена к защите и заслуживает отличной оценки.

Рецензент:
Профессор кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии
ФГБОУ ВО БГМУ МЗ РФ,
доктор биологических наук


(подпись) Б.Р. Кулуев
«20» июня 2017 г.

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу обучающегося 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. Биология **Бижбаловой Лины Олеговны** на тему «Молекулярно-генетическая конструкция для детекции бактерий рода *Campylobacter* в различных средах».

Выпускная квалификационная работа выполнена на актуальную тему. Целью дипломной работы является молекулярно-генетическая конструкция для детекции бактерий рода *Campylobacter* у клинически больных.

Бижбаловой Л.О. обработано большое количество научного материала отечественных и зарубежных авторов. Материал в выпускной квалификационной работе логически структурирован, написан научным стилем изложения.

К положительным сторонам данной работы следует отнести комплексный анализ бактерий рода *Campylobacter*, имеющие тропность к тканям слизистой оболочки тонкой и толстой кишки, обладающие высокой адгезивностью и инвазивностью по отношению к энтеро- и колоноцитам, а также продуцирующие эндотоксин и экзотоксины.

По теме выпускной квалификационной работы опубликованы статья и тезис, что является хорошим научным показателем для студента-бакалавра.

Дипломная работа Бижбаловой Л.О. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к дипломным работам и может быть допущена к защите.

Рецензент:

Научный сотрудник

ФГБУН Института биохимии и генетики

Уфимского научного центра РАН,

кандидат биологических наук



(подпись)

Д.К. Благова

«20» 06 2017 г.



Благова Д.К.
 для документов
 Института биохимии и генетики
 Уфимского научного центра Российской академии наук
 Ф.Р. Гималов

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. Данный отчет не подлежит использованию в коммерческих целях.

Отчет о проверке на заимствования №1

Дата загрузки: 27.06.2017 10:15:20

Автор: Кобзева Наталья Рудольфовна nrkob@mail.ru / ID: 5Проверяющий: Кобзева Наталья Рудольфовна (nrkob@mail.ru / ID: 5)

Организация: Башкирский государственный медицинский университет

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://bashgmu.antiplagiat.ru>

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 1906
Имя исходного файла: ДИПЛОМ
БИЖБАЛОВА Л.О.
Размер текста: 607 кБ
Символов в тексте: 75079
Слов в тексте: 9155
Число предложений: 507

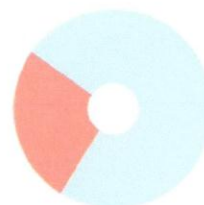
ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Отчет от 27.06.2017 10:15:23 - Последний готовый отчет (ред.)

Комментарии: не указано

Модули поиска:

ЗАИМСТВОВАНИЯ 26.19% ЦИТИРОВАНИЯ 0% ОРИГИНАЛЬНОСТЬ 73.81%



№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте
[01]	0%	3.92%	Скачать выпуск 3 2012	http://pediatr.gpma.ru	21 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет	0	29
[02]	2.85%	3.17%	Download 2012 #3 (10/10)	http://pediatr.gpma.ru	09 Сен 2016	Модуль поиска Интернет	19	22
[03]	0.64%	2.31%	Инструкция по применению тест-сист...	http://pandia.ru	04 Фев 2014	Модуль поиска Интернет	10	36
[04]	0%	2.21%	253832	http://biblioclub.ru	19 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	0	25
	0%	2.21%	60134	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	25
[06]	0.42%	2.08%	Похлюк Анастасия Геннадьевна Похи...	не указано	05 Мая 2017	Кольцо вузов	7	45
[07]	0.12%	2.05%	Назмугдинова, Рита Галиевна диссерт...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	2	31
[08]	1.49%	2.03%	Жеребцова, Надежда Юрьевна диссерт...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	11	19
[09]	1.99%	1.99%	Этиологическая значимость и плазми...	http://kpfu.ru	04 Дек 2016	Модуль поиска Интернет	25	25
[10]	0.24%	1.97%	Горина Арина курсовая Арина 4 курс...	не указано	05 Мая 2017	Кольцо вузов	6	36
[11]	0.1%	1.74%	64323	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	3	30
[12]	0.53%	1.68%	Семенов Денис Дмитриевич Курсовой...	не указано	01 Мая 2017	Кольцо вузов	8	29
[13]	0.73%	1.65%	PDF-версия журнала (5/9)	http://spr-journal.ru	20 Окт 2014	Модуль поиска Интернет	10	21
[14]	1.21%	1.57%	ОПЫТ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ...	http://cyberleninka.ru	08 Окт 2015	Модуль поиска Интернет	13	16
[15]	1.56%	1.56%	NYmnik_31998. Бижбалова Лина Олего...	http://umnik.fasie.ru	04 Мая 2017	Кольцо вузов	14	14
	0.65%	1.55%	Захарченко, Наталья Валериевна дисс...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	9	23
[17]	1.01%	1.45%	Полимеразно-цепная реакция (пцр) и ...	http://uchebnka.ru	раньше 2011	Модуль поиска Интернет	5	10
[18]	0%	1.43%	NYmnik_9104. Басангова Рада Владими...	http://umnik.fasie.ru	11 Мая 2017	Кольцо вузов	0	21
[19]	0%	1.43%	NYmnik_19578. Учуров Игорь Алексан...	http://umnik.fasie.ru	12 Мая 2017	Кольцо вузов	0	21
[20]	0.27%	1.4%	Мельник Полина Сергеевна _____ Кур...	не указано	05 Мая 2017	Кольцо вузов	5	29
[21]	0.82%	1.35%	Сидоренко Анастасия Дмитриевна Кур...	не указано	05 Мая 2017	Кольцо вузов	10	17
[22]	0.36%	1.29%	Терегулова, Лилия Михайловна диссер...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	3	10
[23]	0%	1.23%	Минина Юлия Сергеевна Курсовая Ми...	не указано	06 Мая 2017	Кольцо вузов	0	14
[24]	0.25%	1.22%	Лажкова, Любовь Валерьевна диссерт...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	2	9
[25]	1.15%	1.15%	Воспалительные заболевания кишечн...	http://mivt.ru	08 Авг 2014	Модуль поиска Интернет	13	13

[26]	0.44%	1.12%	Шершакова, Надежда Николаевна дисс...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	5	13
[27]	0.26%	1.1%	BKP1.rar/Галиуллин (Баймиев).docx	не указано	28 Мая 2015	Кольцо вузов	4	16
[28]	0%	1.01%	Готовый диплом.docx	не указано	09 Июн 2015	Кольцо вузов	0	16
[29]	0.8%	0.99%	ref_ivanova_EI_part1.rar (2/5)	http://nemedek.ru	30 Янв 2015	Модуль поиска Интернет	5	7
[30]	0.85%	0.96%	Инфекционные болезни	http://lib.rus.ec	24 Авг 2012	Модуль поиска Интернет	8	10
[31]	0.3%	0.94%	ref_Nemchenko.rar (3/6)	http://nemedek.ru	30 Янв 2015	Модуль поиска Интернет	7	19
[32]	0.93%	0.93%	Читать книгу Теоретические основы и...	http://knigi.net	28 Фев 2017	Модуль поиска Интернет	7	7
[33]	0.9%	0.9%	МАРКЕРЫ КИШЕЧНОГО ВОСПАЛЕНИЯ...	http://cyberleninka.ru	01 Дек 2014	Модуль поиска Интернет	10	10
[34]	0%	0.89%	«СИГНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ	http://bg.anrb.ru	24 Дек 2014	Модуль поиска Интернет	0	11
[35]	0.58%	0.88%	213447	http://e.lanbook.com	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Лань"	3	5
[36]	0.26%	0.84%	Апробация протокола выделения ДНК...	http://kazatu.kz	29 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет	2	13
[37]	0%	0.82%	Молекулярно-генетическая характери...	http://dslib.net	21 Апр 2016	Модуль поиска Интернет	0	7
[38]	0.81%	0.81%	Диссертация	http://vector.nsc.ru	14 Дек 2016	Модуль поиска Интернет	8	8
[39]	0.12%	0.76%	Шурахова, Юлия Николаевна диссерт...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	2	9
[40]	0.75%	0.75%	Download 2012 #3 (9/10)	http://pediatr.gpma.ru	09 Сен 2016	Модуль поиска Интернет	7	7
[41]	0%	0.71%	59868	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	7
[42]	0%	0.69%	253816	http://bibliodub.ru	19 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	0	6
[43]	0%	0.69%	59810	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	6
[44]	0.68%	0.68%	Булахов, Антон Валерьевич диссертаци...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	8	8
[45]	0%	0.59%	Неверовская Анастасия Валерьевна ЛИ.	не указано	22 Мая 2017	Кольцо вузов	0	13
[46]	0%	0.59%	Гейно Ксения Евгеньевна Diplom_Geyn...	не указано	04 Июн 2017	Кольцо вузов	0	13
[47]	0.12%	0.59%	Горбачевич Ангелина Александровна ...	не указано	18 Мая 2017	Кольцо вузов	1	13
[48]	0%	0.59%	ДИПЛОМ____	не указано	23 Мая 2017	Кольцо вузов	0	13
[49]	0%	0.59%	ДИПЛОМ____	не указано	22 Мая 2017	Кольцо вузов	0	13
[50]	0%	0.59%	ДИПЛОМ____	не указано	24 Мая 2017	Кольцо вузов	0	13
[51]	0%	0.59%	Крижановская Екатерина Олеговна ди...	не указано	21 Мая 2017	Кольцо вузов	0	14
[52]	0%	0.59%	диплом Валериана	не указано	23 Мая 2017	Кольцо вузов	0	14
[53]	0.26%	0.43%	Лаврова, Дарья Вильямовна диссертаци...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	3	5
[54]	0.1%	0.43%	BKP.rar/Ильясова(Баймиев).docx	не указано	12 Мая 2015	Кольцо вузов	1	5
[55]	0%	0.4%	Современные проблемы биохимии. М...	http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"	0	5
[56]	0%	0.4%	235695	http://bibliodub.ru	19 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	0	5
[57]	0.16%	0.4%	Современные проблемы биохимии. М...	http://books.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"	2	5
[58]	0%	0.4%	Постановка реакции ПЦР. Отчет по гр...	http://bibliofond.ru	раньше 2011	Модуль поиска Интернет	0	5
[59]	0%	0.4%	65522	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	5
[60]	0.09%	0.36%	Рыжих, Павел Геннадьевич диссертаци...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	1	5
[61]	0.11%	0.36%	ОБЩАЯ ФИТОПАТОЛОГИЯ. Учебное по...	не указано	22 Фев 2017	Модуль поиска ЭБС "Юрайт"	5	6
[62]	0.34%	0.34%	45637	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	3	3
[63]	0%	0.33%	260196	http://e.lanbook.com	10 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	5
[64]	0.17%	0.33%	Практическая гастроэнтерология. В 2 ч.	http://bibliodub.ru	11 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	4	7
[65]	0%	0.28%	Матнязов, Рустам Тахирович диссерт...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	0	4

[66]	0.07%	0.27%	Барышникова, Наталья Владимировна.	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	коллекция диссертаций РГБ	2	6
[67]	0%	0.26%	59604	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	3
[68]	0.04%	0.25%	Молекулярно-генетические механизмы...	http://books.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"	1	4
[69]	0.07%	0.25%	Клево, Елена Ивановна диссертация ...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	1	2
[70]	0%	0.25%	Федотчева, Татьяна Александровна ди...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	0	5
[71]	0.23%	0.23%	115063	http://bibliodub.ru	14 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	1	1
[72]	0%	0.21%	Острые кишечные инфекции в практи...	http://books.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"	0	3
[73]	0%	0.21%	59858	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	3
[74]	0%	0.21%	диссертация	не указано	25 янв 2013	Модуль поиска "БГМУ"	0	2
[75]	0%	0.21%	60078	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	0	4
[76]	0.11%	0.2%	Боравкова, Ольга Владимировна диссе...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	2	2
[77]	0.15%	0.2%	ДиссерЛ	не указано	08 Фев 2013	Модуль поиска "БГМУ"	1	2
[78]	0.1%	0.18%	Семеняхин, Владимир Иванович диссе...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	2	4
[79]	0%	0.18%	Селиверстова, Наталья Андреевна дис...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	0	2
[80]	0%	0.16%	Савин, Иван Сергеевич диссертация	http://dlib.rsl.ru	07 Мар 2012	Коллекция диссертаций РГБ	0	2
[81]	0%	0.14%	Микробиология продуктов животного.	http://books.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"	0	1
[82]	0%	0.12%	Диссертация	http://vniigis.ru	15 Дек 2016	Модуль поиска Интернет	0	2
[83]	0%	0.11%	Безопасность продовольственного сы...	http://bibliodub.ru	20 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	0	2
[84]	0%	0.09%	Основы педиатрии и гигиены: Учебни...	http://books.ru	09 Дек 2016	Модуль поиска ЭБС "Айбукс"	0	1
[85]	0.01%	0.08%	43390	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"	1	2
[86]	0%	0.08%	Головенко, Олег Владимирович диссер...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	0	1
[87]	0%	0.07%	Орлова, Клавдия Александровна диссе...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ	0	2
[88]	0%	0.07%	104240	http://bibliodub.ru	13 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"	0	2
[89]	0%	0.04%	Роль микроорганизмов в функционир...	http://bibliorossica.com	27 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссия"	0	1