

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

Иванова Светлана Сергеевна



**ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ
МИКОБАКТЕРИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ
БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор


(подпись)

А.Р. Мавзютов

Научный консультант:
кандидат биологических наук


(подпись)

Л.Р. Хакимова

Уфа – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	3
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1. Микрофлора легких человека	8
1.2. Предполагаемые возбудители ХОБЛ	11
1.2.1. Факторы и механизмы вирулентности микобактерий	17
1.3. Лабораторные методы исследования хронической обструктивной болезни легких	19
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	24
2.1. Объекты и материалы исследования	24
2.2. Методы исследования	24
2.3. Выделение ДНК	25
2.4. ПЦР-анализ препаратов ДНК клинического материала	27
2.5. Детекция ПЦР-продуктов методом агарозного гель-электрофореза	29
2.5.1. Статистический анализ	31
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	32
3.1. Подбор родоспецифичных праймеров	32
3.2. Детекция микобактерий в клиническом материале методом ПЦР	33
3.3. Исследование показателей анализа крови при ХОБЛ	41
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	49
ВЫВОДЫ	50
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	51

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

НТМ – нетуберкулезные микобактерии

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

МАС – *Mycobacterium avium complex*

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. По данным Всемирной организации здравоохранения на сегодняшний день хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) занимает 4 место по смертности в мире в возрастной группе старше 45 лет, при этом смертность неуклонно растет (Чучалин, 2003; Шмелев, 2003). Данные о распространенности, болезненности и смертности от ХОБЛ заметно недооценивают общий ущерб от болезни, так как обычно ХОБЛ не распознается и не фиксируется до тех пор, пока не становится клинически значимой. Значительный рост повсеместного ущерба от ХОБЛ отражается в увеличении курения, профессиональных факторах, наследственной предрасположенности, а также изменение возрастной структуры населения (Трухан, Викторова, 2013).

Заболевание проявляется в том, что оно развивается на протяжении длительного времени и поражает человека в период наивысшей жизненной активности. На первых этапах ХОБЛ протекает без клинических проявлений, больные жалоб не имеют (Чучалин, 2003; Шмелев, 2003).

Доказано, что наиболее частыми причинами обострений ХОБЛ являются бактериальные и вирусные респираторные инфекции и загрязняющие вещества в атмосферном воздухе, однако причиной примерно 20-30% случаев обострений установить не удастся. (White, et al., 2003; Veeramachaneni, Sethi, 2006; Papi et al, 2006). Среди бактерий при обострении ХОБЛ обнаруживаются нетипируемые *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Moraxella catarrhalis*, энтеробактерии и *Pseudomonas aeruginosa*. Но в последнее время исследование нетуберкулезных микобактерий показало их этиологическую значимость (Sethi et al., 2002; Veeramachaneni, Sethi, 2006; Авдеев, 2009).

Род микобактерий насчитывает более 50 видов и подвидов микобактерий (Оттен, Васильев, 2005; Отева, Полонская, 2013).

Считается, что большинство пациентов заражаются нетуберкулезными микобактериями из окружающей среды, но механизм их поступления в организм точно не известен, при этом нетуберкулезные микобактерии могут играть важную роль в возникновении респираторных заболеваний (Falkinham, 2002; Falkinham, 2003; Отева, Полонская, 2013).

Микобактериозы легких получили в последние годы известность в связи с улучшением лабораторных методов выделения и идентификации нетуберкулезных микобактерий. Диагностика микобактериоза остается сложной проблемой, так как большая часть нетуберкулезных микобактерий является условно-патогенной и до настоящего времени не разработаны методы постановки диагноза и подходы к лечению этого заболевания (Литвинов и др., 2008; Суркова и др., 2015).

Цель исследования

Совершенствование методологии ПЦР-детекции нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале и экспериментальная оценка частоты их встречаемости при ХОБЛ.

Задачи исследования

1. Сбор клинического материала (мокроты).
2. Выделение ДНК с помощью набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ».
3. Амплификация ДНК с родоспецифичными праймерами.
4. Анализ частоты встречаемости микобактерий при ХОБЛ и сравнение с другими диагнозами.

Практическая значимость

На основании проведенных исследований предложена тест-система, обеспечивающая лабораторную детекцию нетуберкулезных микобактерий при ХОБЛ на ранних стадиях заболевания, при которых детекция возбудителя обычными методами проблематична. Проведена сравнительная характеристика информативности разработанной тест-системы для обнаружения нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ХОБЛ – заболевание, характеризующееся персистирующим ограничением скорости воздушного потока, которое обычно прогрессирует и связано с выраженным хроническим воспалительным ответом легких на действие патогенных частиц или газов. По данным ВОЗ, в настоящее время, ХОБЛ является 4-й лидирующей причиной смерти в мире. Хотя ХОБЛ поражает легкие, она также имеет значительное влияние на весь организм.

Заболевание может длиться несколько десятков лет. Клиническая картина при курении проявляется через 20-30 лет после начала курения. Долгое время ХОБЛ протекает без ярко выраженных клинических симптомов, больные жалоб не предъявляют.

Первый симптом заболевания - кашель. Затем кашель становится ежедневным, чаще всего наблюдается днем. Кашель может носить приступообразный характер и провоцироваться различными факторами окружающей среды.

Второй симптом заболевания – появление мокроты. В начале заболевания мокрота выделяется в небольшом количестве и имеет слизистый характер.

Третий клинический симптом – появление одышки. Возникает, примерно, на 10 лет позже кашля и сначала ощущается только при значительной нагрузке, усиливаясь на фоне респираторных инфекций. По мере снижения легочной функции одышка становится более выраженной.

Основными причинами возникновения ХОБЛ являются:

- Курение. Смертность от ХОБЛ среди тех, кто не может отказаться от курения, наиболее высока, так как из-за этого развивается непроходимость дыхательных путей, появляется одышка. Однако и среди некурящих нередки случаи возникновения и прогрессирования ХОБЛ.
- Патогенные частицы. Наиболее вредоносными частицами является пыль, содержащая кадмий и кремний. Профессии с повышенным риском

развития ХОБЛ - шахтеры; строители, рабочие металлургической промышленности, железнодорожники.

- Генетические факторы. В настоящее время единственной хорошо изученной генетической патологией, ведущей к ХОБЛ, является дефицит α -антитрипсина (ААТ). Но вклад этой причины в формировании ХОБЛ значительно меньший, чем курение.

Обострение ХОБЛ – одна из самых частых причин обращения больных за медицинской помощью (Авдеев, 2014). Развитие обострений у больных ХОБЛ приводит к ухудшению показателей функции дыхания, более быстрому прогрессированию заболевания, значительному снижению качества жизни больных. Эти факторы сопряжены с существенными экономическими расходами на лечение (Авдеев, 2013). Заболеваемость ХОБЛ на данный момент недостаточно изучена. Заболеваемость может заметно различаться как в разных странах, так и в разных регионах страны. Профилактика обострений является одной из основных терапевтических целей, но имеющиеся в настоящее время методы лечения обострений не очень эффективны. Считалось, что бактерии являются основной инфекционной причиной обострений, но с развитием новых диагностических методов выяснилось, что респираторные вирусы также часто обнаруживаются при обострениях ХОБЛ. (Beasley et al., 2012).

Бактериальная инфекция считается ведущей причиной обострений ХОБЛ. Наиболее частыми причинами обострений ХОБЛ являются бактериальные и вирусные респираторные инфекции, но причины примерно 20–30 % случаев обострений установить не удастся (Pari et al., 2006). Среди бактерий при обострении ХОБЛ наибольшую роль играют нетипируемые *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Moraxella catarrhalis* (Veeramachaneni, Sethi, 2006). Также при тяжелых обострениях у больных ХОБЛ могут встречаться грамотрицательные микроорганизмы, в том числе *Pseudomonas aeruginosa*.

1.1. Микрофлора легких человека

Длительное время считалось, что бронхиальное дерево здорового человека стерильно. Но современные молекулярно-генетические методы показали, что легкие здорового некурящего человека населены сообществами микроорганизмов (Berger, Wunderink, 2013; Dickson, Huffnagle, 2015).

Исследование микробиома дыхательных путей у здорового человека является необходимым шагом для оценки роли микроорганизмов в развитии болезней легких, ассоциированных с инфекционным процессом (Beck, et al., 2012).

Вдыхание аэрополлютантов рассматривается в качестве ключевого пускового фактора в патогенезе ХОБЛ, поскольку инициирует и поддерживает персистирующее воспаление в бронхиальном дереве. Однако лишь у 15% курильщиков развивается ХОБЛ, что, возможно, обусловлено наличием у этих лиц генетической восприимчивости или воздействием дополнительных факторов воспаления. Так, у бывших курильщиков при ХОБЛ в дыхательных путях сохраняется стойкое поддержание активности воспалительных маркеров (в частности, увеличенное количество рекрутированных нейтрофилов и эозинофилов), свойственное для лиц, продолжающих курить. Персистирующее воспаление при ХОБЛ у лиц, прекративших курение, можно объяснить хронической микробной колонизацией дыхательных путей.

Традиционные бактериологические методы показали, что примерно 50% обострений ХОБЛ связано с конкретными микроорганизмами: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Moraxella catarrhalis*, на поздних стадиях заболевания – *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.* (Bilde, et al., 2007). В период обострения эти микроорганизмы обнаруживают в секрете дыхательных путей. Так как многие из этих бактерий персистируют в дыхательных путях, они могут способствовать хроническому воспалению, что патогенетически приводит к прогрессированию ХОБЛ. (Berger,

Wunderink, 2013; Dickson, Huffnagle, 2015). При этом чаще всего бронхиальное дерево у здоровых людей колонизируют такие микроорганизмы, как бактерии рода *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria* и *Veillonella*. Реже встречаются потенциально патогенные *Haemophilus* и *Neisseria* (Beck, et al., 2012). Среди этих микроорганизмов есть анаэробы, такие как *Prevotella spp.*, с трудом произрастающие на специальных средах. *Bacteroidetes* более распространены у здоровых людей, чем у пациентов с бронхиальной астмой и ХОБЛ. Снижение колонизации *Bacteroidetes* в бронхиальном дереве у больных бронхообструктивными заболеваниями по сравнению со здоровыми людьми, вероятно, является следствием трансформации нормальной микрофлоры на фоне болезни. Так, респираторный тракт больных бронхиальной астмой и ХОБЛ представлен большим количеством микроорганизмов типа *Proteobacteria*.

Обострение инфекционного процесса в респираторном тракте является существенным фактором, усугубляющим выраженность бронхиальной обструкции (Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 2011). Наиболее частой причиной развития обострений ХОБЛ считается трансформация бактериальной контаминации в инфекционный процесс. Вместе с тем данные ряда исследований указывают на то, что появление в дыхательных путях больного ХОБЛ новых бактериальных штаммов характеризуется более высоким риском провоцирования обострения болезни, нежели постоянно присутствующие штаммы бактерий, составляющие «привычный» для пациента микробиом. При этом обострения, связанные с появлением «новых» для пациента микроорганизмов, как правило, протекают более тяжело и сопровождаются более выраженными воспалительными изменениями бронхов по сравнению с обострениями, ассоциированными с «привычной» микрофлорой, населяющей бронхиальное дерево больного (Sehti, et al., 2002).

Поскольку биопсия легких не всегда приемлема для здоровых людей, изучение микробиоты легких было, главным образом, основано на исследовании образцов мокроты. Идентификация микроорганизмов в образцах сложна; необходимы вспомогательные рентгенологические и клинические данные для установления диагноза. Но полагаться на достоверность анализа этих образцов для определения микрофлоры легких, является проблематичным из-за загрязнения мокроты отделяемым верхних дыхательных путей или ротовой микрофлорой (Berger, Wunderink, 2013). На сегодняшний день, известно только несколько методов исследования микробиоты человеческой легочной ткани. Эти исследования имеют существенные ограничения, включая малый размер выборки и использование образцов, в основном, от пациентов с тяжелыми заболеваниями легких, таких как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) или кистозный фиброз (Sze et al., 2015).

Большинство поверхностей верхних дыхательных путей (в том числе носоглотка и ротоглотка) заселены бактериями у здоровых людей. Эти микроорганизмы представляют собой нормальную флору дыхательных путей и редко вызывают заболевания. В носоглотке обычно находятся *Staphylococcus epidermidis*, *Haemophilis spp.*, также могут присутствовать *Staphylococcus aureus*.

Наиболее часто встречаемыми при ХОБЛ микроорганизмами, выделенными из мокроты или бронхоскопических образцов являются *H. influenza*, *Str. pneumonia*, *M. catarrhalis*, *Mycobacterium spp*, *Listeria*. Однако бактериальная флора при ХОБЛ зависит от тяжести заболевания, так грамотрицательные организмы, такие как синегнойная палочка чаще обнаруживается у пациентов с более тяжелой обструкцией дыхательных (Engler, Muhlemann, 2012). Синегнойная палочка часто присутствует в бронхиальном дереве у пациентов, и с ней связано около 5–10% обострений ХОБЛ (Sethi, Murphy, 2008). *P. aeruginosa* рассматривается как важный микробный агент в патогенезе обострений ХОБЛ. Инфекция *P. aeruginosa*

при ХОБЛ может продемонстрировать кратковременную колонизацию с последующим быстрым очищением респираторного тракта. Однако, в ряде случаев, наблюдается долговременное нахождение синегнойной палочки в дыхательных путях больного, характеризующееся частой сменой клонов микроорганизма и внутриклоновым микроэволюционированием. Все это приводит к повышению частоты мутаций *P. aeruginosa* и развитию устойчивости возбудителя к воздействию различных антибактериальных препаратов, в частности за счет увеличения продукции биопленок (Rakhimova et.al., 2009).

1.2. Предполагаемые возбудители ХОБЛ

Нетуберкулезные микобактерии.

Атипичные (нетуберкулезные, нелепрозные) микобактерии относятся к семейству *Mycobacteriaceae* и отличаются от *M. tuberculosis* по потребности в питательных веществах, способности образовывать пигменты, ферментной активности и чувствительности к противотуберкулезным средствам. Кроме того, *M. tuberculosis*, как правило, распространяется от человека к человеку, а заражение атипичными микобактериями происходит при контакте с окружающей средой.

Вирулентность как степень патогенности является ключевым понятием для возбудителей инфекционных заболеваний. Изучение вирулентности НТМ является чрезвычайно сложной проблемой вследствие многочисленности возбудителей микобактериоза и достаточно слабой природной патогенности: случаев передачи микобактериоза от человека к человеку не зафиксировано. Следует подчеркнуть, что вирулентность возбудителя не существует сама по себе, а реализуется всегда только в системе хозяин – патоген, и потому ее уровень самым тесным образом зависит от чувствительности или резистентности макроорганизма к данной инфекции (Вишневский, Маничева, и др., 2015).

Потенциально патогенные нетуберкулезные микобактерии занимают промежуточное положение между вирулентными абсолютными патогенами (*M. tuberculosis complex*, *M. leprae*) и сапрофитами. Микобактерии – это микробы окружающей среды, встречающиеся повсеместно, в том числе в воде, почве, воздухе, у растений, животных и человека (Mehdi Mirsaedi, et.al., 2014). Тем не менее нетуберкулезные микобактерии вызывают у человека широкий спектр клинических заболеваний, имеющих общее название микобактериоз. Наиболее часто встречаются легочные заболевания с широким спектром возбудителей НТМ, лимфаденит у детей, различные поражения кожи (Van Ingen J., 2013), а также поражения других органов.

Микобактериоз (лат. *Mycobacteriosis*) — инфекционное заболевание животных и человека, возбудителями которого являются представители большой группы НТМ. Вероятными факторами развития микобактериоза являются, главным образом, нарушения иммунитета, к которым приводят лечение иммунодепрессантами, пожилой возраст, сахарный диабет, хронические легочные заболевания (пневмокониозы, силикоз и др.), хирургические вмешательства, хронический стресс, а также многие другие заболевания и состояния. Однако в последние годы появились сообщения, что микобактериозу могут быть подвержены и иммунокомпетентные лица (Orme , Ordwa, 2014), что делает проблему еще более актуальной. Развитие патологии, вызываемой НТМ, в значительной мере обусловлено распространением ВИЧ-инфекции. Более того, некоторые исследователи считают, что микобактериозы у ВИЧ-инфицированных пациентов — это индикаторы развития СПИД. Распространенность заболеваний, вызванных этими микроорганизмами, неуклонно растет.

Исследования также показали, что риск легочных инфекций, вызванных нетуберкулезными микобактериями растет, особенно у людей старше 50 лет (Winthrop et.al., 2010). Многие виды нетуберкулезных микобактерий способны к образованию биопленок, что способствует устойчивости к антибиотикам (Johnson, Odell, 2014).

Число выделенных и описанных микобактерий постоянно растет. В настоящее время насчитывается более 150 видов нетуберкулезных микобактерий, 40 из которых могут являться возбудителями заболеваний легких. В последние годы быстрое увеличение выявления новых видов связано с улучшением методов культивирования и точной дифференциацией видов. Дифференциация видов усовершенствовалась с развитием молекулярных методов, которые позволили обнаружить различия в гене 16S рРНК (Johnson, Odell, 2014). Микобактерии продолжают считать безопасными, так как передача инфекции от человека к человеку не установлена и не подлежит обязательной регистрации.

Нетуберкулезные микобактерии делятся на 4 группы:

1. медленнорастущие фотохромогенные (*M. kansasii* и др.). Главным признаком представителей этой группы является появление пигмента на свету. Они образуют колонии от S до RS-форм, содержат кристаллы каротина, окрашивающие их в желтый цвет. Скорость роста от 7 до 20 дней при 25, 37 и 40 °C, катадазоположительны. *M. kansasii* - желтые бациллы, обитают в воде, почве, поражают легкие. Эти бактерии можно идентифицировать за счет их больших размеров и крестообразного расположения. Важным проявлением инфекций, вызванных *M. kansasii*, считается поражения кожи и мягких тканей, остеомиелита, лимфаденитов, перикардитов.

2. медленнорастущие скотохромогенные (*M. scrofulaceum*, *M. matmoense*, *M. gordonae* и др.). Микроорганизмы образуют в темноте желтые, а на свету оранжевые колонии S-формы, растут при 37 °C. Это самая многочисленная группа нетуберкулезных микобактерий. Они выделяются из загрязненных водоемов и почвы и являются условно-патогенными для человека и животных. *M. matmoense* - микроаэрофилы, образуют серовато-белые гладкие блестящие непрозрачные куполообразные круглые колонии. Эти микроорганизмы растут очень медленно при 22-37 °C. Нахождение их на свету не вызывает продукции пигмента. У человека они вызывают

хронические заболевания легких. *M. gordonae* – распространенные повсеместно сапрофиты, скотохромогены водопроводной воды, микобактериоз вызывают крайне редко. Помимо воды их часто выделяют из почвы, бронхиального секрета или другого материала от больных, но в большинстве случаев они оказываются непатогенными для человека. В то же время имеются сообщения о случаях менингита, перитонита и кожных поражений, вызванных этим видом микобактерий.

3. медленнорастущие нехромогенные микобактерии (*M. avium complex*, *M. gaslri* *M. terrae complex* и др.). Они образуют бесцветные S-, SR- или R-формы колоний, которые могут иметь светло-желтые. Выделяются от больных животных, из воды и почвы. *M. avium* - *M. intracellulare* объединены в один *M. avium complex* так как их межвидовая дифференциация представляет определенные трудности. Микроорганизмы растут при 25-45 °С, наиболее часто эти микроорганизмы вызывают у человека поражения легких. Описаны поражения кожных покровов, мышечной ткани и костного скелета. Они входят в число возбудителей оппортунистических инфекций, осложняющих синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). Стандартные методы очистки воды не инактивируют данный микроб.

4. быстрорастущие микобактерии (*M. fortuitum complex*, *M. phlei*, *M. chelonae* и др.). Растут в виде R- или S-форм колоний в течение 1-7 дней. Они обнаруживаются в воде, почве и являются представителями нормальной микрофлоры человека. Бактерии этой группы редко выделяются из патологического материала от больных, однако некоторые из них имеют клиническое значение. *M. fortuitum complex* включает *M. fortuitum* и *M. chelonae*. Они вызывают кожные и послеоперационные инфекции, заболевания легких. Микробы данного комплекса высокоустойчивы к противотуберкулезным препаратам.

В настоящее время *M. avium complex* и *M. kansasii* считаются самыми распространенными видами НТМ, вызывающими заболевания легких у человека, причем *M. avium complex* составляет почти половину всех

микобактериальных инфекций. В пределах вида *M. avium* выделяют несколько подвидов, которые ассоциированы с определенным кругом хозяев, экологическими и географическими характеристиками штаммов. Наибольшее клиническое значение имеют микроорганизмы *M. avium subsp. hominissuis*, вызывающие микобактериоз у людей (González-Pérez, et.al., 2013). Далее по распространенности идут *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* и *M. abscessus*. Редко отмечают случаи заболевания здоровых людей сапрофитными видами микобактерий, такими как *M. gordonae*, *M. peregrinum*, и некоторыми другими, например *M. lentiflavum* (Nakazawa et.al., 2012).

По мнению некоторых исследователей, такие виды, как *M. gordonae* и *M. simiae*, вызывают колонизацию и редко могут быть причиной инфекции. Трудности диагностики микобактериозов легких обусловлены сходством их клинических, рентгенологических и морфологических проявлений с туберкулезом.

P. aeruginosa - вид грамотрицательных подвижных палочковидных бактерий. Обитает в воде и почве, является условно – патогенным микроорганизмом для человека. Факторами патогенности *P. aeruginosa* является наличие подвижности, образование токсинов, продукция гидролитических ферментов. Многие штаммы синегнойной палочки могут продуцировать слизь, основой которой является альгинат — гелеобразующий полимер, собранный из β -1,4-связанных мономеров D-маннуроновой и L-гиалуроновой кислоты. В состав слизи могут входить рамнолипиды, Pls- и Rel-полисахариды, дериваты клеточной ДНК, протеины.

Moraxella catarrhalis. *Moraxella* – группа неферментирующих условно – патогенных грамотрицательных микроорганизмов, обитающих на слизистых оболочках у человека и животных. *M. catarrhalis* может вызывать инфекции верхних и нижних дыхательных путей.

Streptococcus pneumonia — вид грамположительных факультативно – анаэробных гемолитических бактерий. Клетки *Str. pneumoniae* имеют

сферическую форму. Чаще всего располагаются попарно, но в жидких питательных средах образуют цепочки. *Str. pneumoniae* является вторым по распространённости и важности пневмотропным микроорганизмом в микробном спектре при хронических заболеваниях легких в периоде обострения. Пневмококковая инфекция, по данным ВОЗ, является ведущей причиной смертности.

Haemophilus influenza — вид грамотрицательных бактерий. Является возбудителем тяжелых заболеваний человека. Имеет вид неподвижной яйцевидной палочковидной коккобациллы. Располагается одиночно, попарно или скоплениями, иногда образует капсулу. Жгутиков не имеет. *H. influenzae* поражает только человека. Резервуаром инфекции являются носители или больные острыми респираторными заболеваниями, протекающими в легкой или клинически невыраженной форме.

Для гемофильных бактерий характерен, так называемый, феномен кормушки или сателлита, который проявляется в их способности расти вокруг колоний стафилококков или других бактерий, продуцирующих НАД или вызывающих гемолиз. Для самих гемофильных палочек, способность вызывать гемолиз не характерна. Мелкие радужные колонии гемофильных бактерий могут быть обнаружены только в зоне гемолиза, образуемой другими микроорганизмами, например стафилококками.

Первоначально *H. influenzae* идентифицировали как возбудителя гриппа, после установления вирусной природы гриппа обнаружилось, что микроб является одним из возбудителей пневмонии, заболеваниям подвержены дети, а также взрослые с ослабленным иммунитетом. *H. influenzae* поражает только людей. Капсула является фактором патогенности и защищает микроорганизм от действия иммунной системы человека.

1.2.1. Факторы и механизмы вирулентности микобактерий

Механизмы вирулентности НТМ, имеют общие черты для всех инфекционных патогенов:

- адгезия — способность микроорганизма прикрепляться к клеткам организма-хозяина с помощью различных адгезинов (различных белков, тейхоевых кислот, липополисахаридов);
- инвазия — проникновение в клетки хозяина за счет продукции определенных ферментов (гиалуронидаза, нейраминидаза), а также факторов, подавляющих клеточную защиту; адаптация к условиям макроорганизма-хозяина за счет ряда механизмов, позволяющих «ускользнуть» от иммунологических факторов защиты, включая персистенцию, т. е. переход в дормантное состояние;
- агрессия — противостояние защитным (иммунным) факторам макроорганизма за счет продукции различных ферментов (Julián et.al., 2010).

Принято считать, что у НТМ отсутствует корд-фактор, обуславливающий рост микроколоний МБТ в виде «жгутов» и «кос» и играющий существенную роль в вирулентности МБТ. На этом основан дифференциально-диагностический признак различия микроколоний микобактерий (Вишневский, Маничева, 2015).

Исследования последних лет свидетельствуют о большей вирулентности шероховатых (грубых) колоний НТМ. Непрозрачные колонии *M. fortuitum* в 4–9 раз сильнее ингибируют производство оксида азота, индуцированного в макрофагах гамма-интерфероном, а также ограничивают слияние фагосомы с лизосомой (Kim K.H. et.al., 2014). Имеются данные, что шероховатые *M. scrofulaceum* вызывают более выраженные воспалительные реакции и обладают большей вирулентностью, чем гладкие. На это же указывают исследования с *M. abscessus*, выделенных от больных с хроническими поражениями легких (Park et.al., 2015).

Из других фенотипических видов изменчивости НТМ, которые могут ассоциироваться с вирулентностью, является принадлежность к определенному серовару. Так, для вирулентности *M. avium* наибольшее значение имеют серовары 4 и 8. У *M. avium* сероваров 4 и 8 наиболее выражена гемолитическая активность, поскольку гемолизин является одним из факторов вирулентности НТМ, необходимой для инвазии в клетки макроорганизма-хозяина (Guirado et.al., 2012).

Важнейшими факторами вирулентности ряда потенциально патогенных микобактерий являются фенольные гликолипиды, в частности липоарабиноманнан (LAM), гликопептидолипиды (GPLs) и phthiocerol dimycocerosates (PDIMs) клеточной стенки микобактерий. Это относится главным образом к *MAC*, а также *M. kansasii*, *M. marinum* (Vergnolle et.al., 2015). Установлено, что гликопептидолипиды *M. smegmatis* специфически ингибируют фагоцитоз в человеческих макрофагах. Кроме того, эти липиды играют большую роль в образовании бактериальных биопленок как факторов приспособления микобактерий (Вишневский, Маничева и др., 2015).

Некоторые виды НТМ продуцируют экзотоксин — миколактон, который является основным фактором вирулентности *M. ulcerans*. Миколактон по химической структуре представляет собой поликетидное производное макролида. Токсин имеет сродство к жировым клеткам, обладает цитотоксическим эффектом, способствуя развитию некротических процессов, и иммуносупрессивным действием, так как в некротической фазе заболевания снижается чувствительность кожных проб (Käser et.al., 2009).

Плазмиды (внехромосомные генетические элементы) играют важную роль в вирулентности НТМ. Доказано, что *MAC*, несущие плазмиды, обладают высокой каталазной активностью и вирулентностью. На значение плазмид в вирулентности НТМ указывает тот факт, что наибольшая частота носительства плазмид была у клинических изолятов *MAC* (Uchiya et.al., 2015).

НТМ обладают комплексом генов, детерминирующих различные факторы вирулентности. Отличительной чертой микобактерий от других патогенов является то, что у них обнаружен дополнительный тип секреции продуктов жизнедеятельности клетки во внешнюю среду (VII тип).

Система секреции ESX-1, ответственная за секрецию белков ESAT-6 и CFP-10, играет важнейшую роль в вирулентности *M. marinum* (Kennedy et.al., 2014), но гены, необходимые для секреции ESAT-6 системой секреции ESX 1, находятся за пределами локуса RD1.

НТМ могут повлиять на различные сложные взаимоотношения с клетками макроорганизма, изменяя различные механизмы иммунитета организма-хозяина. Так, ESX-5 система секреции *M. marinum* модулирует макрофагальный ответ, изменяя уровень TNF- α , IL-6, и вызывает продукцию воспалительных цитокинов. Клинические штаммы *M. kansasii* могут индуцировать гибель макрофагов макроорганизма (Rahman et.al., 2014).

1.3.Лабораторные методы исследования хронической обструктивной болезни легких

Современные молекулярно-генетические методы идентификации микроорганизмов открывают новые возможности для полноценного анализа микробиома респираторного тракта, как у здоровых людей, так и у пациентов с различными заболеваниями дыхательной системы. Молекулярные методы идентификации основаны на более быстром выявлении видов.

В настоящее время исследование состава сообщества микроорганизмов и его взаимодействия с организмом-хозяином является главной задачей, решение которой необходимо для последующего выявления молекулярных маркеров диагностики и профилактики ХОБЛ. Полученные результаты позволят не только уточнить вклад микроорганизмов в формирование и прогрессирование ХОБЛ, но и создадут предпосылки для

стратегического пересмотра концепции лечения хронической обструктивной патологии легких (Федосенко и др., 2014).

На сегодняшний день, знание патогенетической роли штаммов *MAS* (*Mycobacterium avium* complex) в легких человека, и окончательные критерии инициирования множественной лекарственной терапии до сих пор отсутствуют. Обнаружение микобактерий и определение их чувствительности к лекарственным средствам основано на культуре, которая является трудоемким, сложным, дорогостоящим и длительным процессом. Установление наличия микобактерий по культуре занимает около 2-4 недель, а затем еще на 1-2 недели для тестирования чувствительности к лекарственным препаратам (Manual of Clinical Microbiology, 2015). Существует мнение о том, что кларитромицин является наиболее эффективным препаратом среди различных схем против НТМ. Кларитромицин – полусинтетический 14-членный антибиотик-макролид, производная эритромицина, который взаимодействует с бактериальной 23S рРНК, образуя шпилько-подобную структуру в области II и петли пептидилтрансферазы в области V (Wilson, 2014).

На данный момент, на основе методов культивирования тестирование на лекарственную чувствительность является единственным способом оценки биологической активности антибиотиков против штаммов *MAS*.

Из-за кислотоустойчивости микобактерий, их окрашивание свидетельствует о ложном результате, в связи с этим используются методы молекулярной диагностики. Но, посев мокроты может стать более чувствительным методом для идентификации видов микобактерий. Кроме того, тестирование на лекарственную чувствительность путем посева мокроты важно для выявления резистентных к лекарствам микобактерии. Однако, выделение культур микобактерий является сложным и длительным процессом.

Так же, посев микобактериальных культур из дыхательных путей не может быть выполнен у больных при отсутствии мокроты.

С момента внедрения амплификации нуклеиновых кислот, произошло значительное улучшение методов обнаружения микобактерий.

Из-за высокой чувствительности, быстроты, простоты, отсутствия особых требований для работы с ПБА 3 группы и автоматизации процесса полимеразная цепная реакция (ПЦР) становится все более важной в молекулярной диагностике микобактерий (Shingadia, 2012). Подходы ДНК-секвенирования дают возможность оценить влияние широкого спектра видов НТМ на заболевание. В настоящее время, амплификация и секвенирование *rrs*-гена, кодирующего 16S рРНК, является наиболее распространенным методом идентификации последовательностей микобактерий. Секвенирование *rrs*-гена способствовало открытию ряда неизвестных видов НТМ (Christianson et.al., 2012). В связи с ограниченными клинически значимыми проявлениями микобактериозов, стандартизация молекулярных методов для этих микроорганизмов отсутствует. Есть множество методов для генотипирования *M. avium*, включая вставку последовательности 900, IS1245, и IS1300, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) и ПЦР-методов, таких как чередование повторяющиеся tandemных повторов, анализ мультилокусных последовательностей и секвенирования *hsp65*-гена (Christianson et.al., 2012). Широко используется анализ случайно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD). RAPD-анализ может служить своеобразным экспресс-методом выявления генетического полиморфизма, что особенно актуально для малоизученных таксономических групп. RAPD применяется также для геномного маркирования в различных исследованиях. К недостаткам метода можно отнести низкую воспроизводимость результатов, обусловленную повышенной чувствительностью к условиям реакции: концентрации ионов магния, соотношению праймер/матрица, температурному режиму. Тем не менее, RAPD-анализ может быть использован как экспресс-метод выявления генетического полиморфизма и как источник уникальных локус-специфичных маркеров.

Возрастает роль использования ПЦР в режиме реального времени для обнаружения микроорганизмов, заменяя обычную ПЦР, использующую электрофорез в агарозном геле для выявления продуктов ПЦР. В ПЦР в реальном времени применяются флуоресцентные резонансные переносы энергии (FRET), молекулярные маяки и зонды, которые адаптированы для обнаружения продуктов амплификации в закрытой системе. При этом подходе снижается риск контаминации и одновременно происходит амплификация нескольких последовательностей. Применение красителя SYBR Green в ПЦР в реальном времени позволило улучшить диагностику, в связи с увеличением специфичности, и способности обнаружить два и более микроорганизмов в течение одной реакции.

Амплификация на основе капиллярного гель-электрофореза.

Амплификация на основе капиллярного гель-электрофореза представляет собой альтернативный подход для быстрой и точной идентификации микроорганизма и скрининга, производит высокое разрешение для видовой идентификации. В отличие от традиционного гель - электрофореза, в этом методе используют меченные флуоресцеином 5'-концы праймеров, в результате чего происходит быстрый и точный анализ ампликонов. Идентификация обеспечивается путем секвенирования ДНК. Амплификация на основе капиллярного гель-электрофореза улучшает первоначальную идентификацию и обеспечивает альтернативу высокоэффективной жидкостной хроматографии (Gray, et.al., 2014). Амплифицированные фрагменты представлены одним или более пиками, в зависимости от размера фрагмента.

Преимуществами амплификации на основе капиллярного гель-электрофореза являются простота, быстрота, воспроизводим, имеет минимальные требования для реагентов. Другое преимущество - результаты могут быть визуализированы в центрах с использованием доступных и стандартизированных баз данных. Для сравнения, ВЭЖХ отнимает много времени, требует значительного опыта и лучше всего подходит для

лаборатории с высокой пропускной способностью (Butler, Guthertz, 2001). Дальнейшее расширение базы данных SCGE, с использованием охарактеризованных штаммов, будет постепенно устранять ограничение фрагментов перекрытия между близкородственными видами и будет способен идентифицировать менее распространенные виды.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты и материалы исследования

Был проведен забор клинического материала (мокрота) в пробирки объемом 1,5 мл.

Были исследованы образцы мокроты от 169 человек в возрасте от 18 до 91 лет; среди них 86 мужчин и 83 женщины. Отбор больных проводился в период с апреля 2016 года по август 2016 года с диагнозом хроническая обструктивная болезнь легких. Образцы мокроты исследовали методом ПЦР-анализа.

2.2. Методы исследования

Выделение ДНК из клинического материала с помощью набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ».

Наборы серии «ДНК-сорб» на основе метода Бума позволяют решить основные задачи экстракции ДНК из различных клинических материалов для последующего ПЦР-анализа. Назначение: получение ДНК из клинических образцов, свободного от ингибиторов для проведения ПЦР.

Компоненты набора «ДНК-сорб-АМ»:

- Раствор лизирующий: буферный раствор хаотропного агента. Обеспечивает лизис клинического материала, растворение клеточных и вирусных частиц и высвобождение ДНК;

- Универсальный сорбент: суспензия силики с разрыхлителем в буферном растворе. Силика обеспечивает сорбцию ДНК, растворенной в хаотропном агенте лизирующего раствора. Разрыхлитель препятствует склеиванию силики в присутствии избытка геномной ДНК и слизи клинического материала;

- Раствор отмывочный: водно-спиртовой раствор. Удаляет остатки лизирующего раствора с растворенными ингибиторами ПЦР и другими компонентами клинического материала.
- Комплексный ВКО: суспензия рекомбинантного фага λ с клонированным фрагментом неконкурентного ВКО со стандартизированной концентрацией.
- ТЕ-буфер для элюции: буферный раствор. После добавления к подсушенной силики растворяет сорбированную на ней ДНК.
- ОКО: отрицательный контроль. Используется как контроль контаминации при экстракции ДНК из клинического материала.

2.3. Выделение ДНК

Подготовка к проведению процедуры экстракции ДНК.

- 1) Включаем термостат и установить температуру 65 °С.
 - 2) Лизирующий раствор (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреваем, перемешивая при температуре 65 °С, перемешивая до полного растворения кристаллов.
 - 3) Отбираем нужное количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл. Маркируем их.
 - 4) Подготавливаем и расставляем в штативе пробирки с клиническими образцами. Осаждаем капли клинического материала со стенок и внутренней части крышки пробирки на вортексе, затем перемешиваем содержимое пробирки на вортексе, избегая разбрызгивания и попадания клинического материала на внутреннюю часть крышки.
1. В заранее подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки внести ВКО-комплексного и ВКО-FL по 10 мкл в зависимости от метода детекции продуктов ПЦР. При использовании наборов реагентов с разными методами детекции возможно внесение двух препаратов внутреннего контрольного образца по 10 мкл каждого.

2. Ресуспендируем сорбент, перемешивая на вортексе. Вносим в каждую пробирку ресуспендированного сорбента по 20 мкл, затем вносим раствора лизирующего по 300 мкл.

3. В пробирки вносим исследуемых образцов по 100 мкл, в пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции вносим ОКО 100 мкл.

4. Пробирки плотно закрываем и перемешиваем содержимое на вортексе, затем инкубируем 5 мин при 65°C в термостате.

5. Содержимое пробирок перемешиваем на вортексе и оставляем при комнатной температуре на 2 мин.

6. Осаждаем сорбент центрифугированием при 10 тыс об/ мин в течение 30 сек. Не захватывая сорбент, удаляем надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без фильтра.

7. Добавляем в пробы по 1 мл раствора отмывочного, перемешиваем на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

8. Повторяем п.6.

9. Помещаем пробирки в термостат с температурой 65°C на 5-10 мин для подсушивания сорбента, крышки пробирок должны быть открыты.

10. В пробирки добавляем ТЕ-буфера для элюции ДНК по 100 мкл, используя наконечник с фильтром. Перемешиваем на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Помещаем в термостат с температурой 65 °C на 5 мин. Допускается при необходимости увеличение объема элюции до 150 мкл.

11. Центрифугируем пробирки при 12 тыс об/ мин в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР-анализа.

Пробы можно хранить в течение 1 недели при температуре от 2 до 8 °C или в течение года при температуре не выше минус 16°C. При повторном исследовании проб, содержимое пробирок необходимо перемешать на вортексе и повторить п. 10.

2.4. ПЦР-анализ препаратов ДНК клинического материала

Среди большого многообразия гибридизационных методов анализа ДНК, метод ПЦР наиболее широко используется в клинической лабораторной диагностике. Принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в настоящее время широко используется как для научных исследований, так и для диагностики в практическом здравоохранении. В основе метода ПЦР лежит природный процесс – комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция носит название репликации ДНК.

Основные компоненты реакционной среды:

- ДНК-матрица — выделенная ДНК анализируемого образца, содержащая искомый специфический фрагмент.
- 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.
- Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) — смесь четырех нуклеотидных оснований, «строительных блоков» для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.
- Taq-полимераза — термостабильный фермент, катализирующий удлинение новой цепи ДНК.
- 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».

Ход работы:

1. Располагаем в штативе буфер Таq-полимеразы, дНТФ, растворы праймеров для разморозки, после ресуспендируем на вортексе. Таq-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 – 60°С – 20 сек | | |
| 3. Элонгация – 72°С – 30 сек | | |
| 4. Хранение – 10°С | | |

После окончания процесса ампликоны окрашивали: на чашку Петри вносили по 3 мкл образца и 6 мкл красителя.

2.5. Детекция ПЦР-продуктов методом агарозного геле-электрофореза

Метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд, причем эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности. Гелеобразование идет путем связывания в пространственную

сетку пучков нитей за счет водородных связей между ними. При электрофорезе поры геля должны быть легко проницаемы для молекул биополимеров, чтобы лишь тормозить их миграцию в электрическом поле за счет трения, поэтому для электрофореза применяют агарозные гели с концентрацией от 0,4 до 2%, но не более, так как в более концентрированные агарозные гели молекулы ДНК даже самых малых размеров не могут проникать. Чаще всего пользуются агарозными гелями с концентрацией 1%. Приготовленный в такой концентрации гель позволяет разделять и детектировать молекулы двуцепочечной ДНК от 300 п.н. до 20 000 п.н.

1. Готовим 1 л 2-х-ного ТАЕ буфера путем разбавления 50х-ного ТАЕ буфера в дистиллированной воде. К 20 мл 50х-ного ТАЕ буфера добавляем 980 мл дистиллированной воды. Перемешиваем.

2. Взвешиваем 1.7 г агарозы и добавляем 2 мл 50х-ного ТАЕ буфера, перемешиваем и расплавляем смесь в течение 2-3 минут помешивая. Доводим до кипения. Смесь в колбе становится прозрачного цвета.

3. Разливаем агарозу на ровной поверхности с пластиковыми гребенками. Гель полностью застывает через 15-20 минут.

4. Наливаем в камеру для электрофореза 2х-ный ТАЕ буфер, помещаем в него застывший гель.

5. Пипеткой наносим пробу ДНК с красителем, отрицательный контроль и маркерную лестницу в лунки геля.

6. Подключаем клеммы прибора к источнику питания ((-) находится на старте, (+) – на финише).

7. Запускаем электрофорез при помощи источника питания. На старте пузырей должно быть больше, чем на финише.

8. Электрофорез проводим в течение 20-50 минут, затем вынимаем гель из формы и помещаем в кювету для окрашивания. В кювету наливаем раствор бромистого этидия. Окрашиваем в течение 5-7 минут.

9. Сливаем краситель в колбу. Промываем гель проточной водой. Помещаем его на стекло УФ-трансиллюминатора. Включаем

трансиллюминатор. Фотографируем гель с помощью цифрового фотоаппарата. Фрагменты ДНК появляются в виде светящихся полос при облучении УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

2.5.1. Статистический анализ

На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения из n-числа повторностей (где $n \geq 10$) и их стандартные отклонения. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента, значения t-критерия находили для 95% уровня значимости.

$$\chi^2 = \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

f_o – фактические частоты;

f_e – ожидаемые частоты.

Данные в таблицах и на диаграммах представляют средние арифметические величины и стандартные ошибки, количество повторений указано для каждого случая отдельно.

Результаты обработаны с использованием стандартных пакетов программы Microsoft Excel 2010.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Подбор родоспецифичных праймеров

Для достижения поставленной в нашем исследовании цели, использовали праймеры к специфическим консервативным последовательностям ДНК микроорганизмов рода *Mycobacterium spp* - генам 16S рРНК, депонированным в международном банке нуклеотидных последовательностей EMBL/GenBank/DDBJ. Сравнительный множественный анализ, найденных последовательностей нескольких видов микобактерий, представленных на рисунке 1, с использованием программы «MegAlign» из пакета «Lasergene» фирмы «DNASTAR» (США) выявил наличие консервативных, свойственных только для данной группы микроорганизмов, последовательностей ДНК. К данным последовательностям с помощью программы «PrimerSelect» из пакета компьютерных программ «Lasergene» («DNASTAR, Inc.», США) были подобраны праймеры длиной 20 нуклеотидов состав и подробная характеристика которых представлены в табл. 1

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

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймеров	Тем. отжига	Ожид. размер продукта (пн)
<i>Mycob. spp.</i>	5' – gcgggcgatacgggcagact-3' 5' – aggggcatgatgacttgacg-3'	60°C	580

А



Б

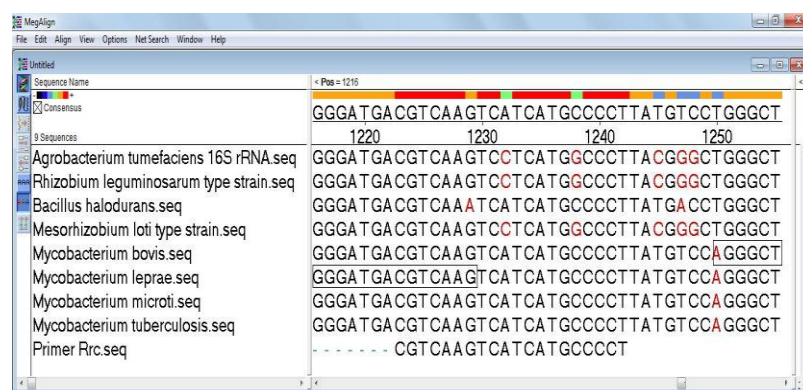


Рисунок 1 - Подбор прямого (А) и обратного (Б) праймеров для детекции *Mycobacterium spp.* (Хисамитдинова, 2014)

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

3.2. Детекция микобактерий в клиническом материале методом ПЦР

Объектом исследования явились 169 пациентов, находящихся на стационарном лечении с различными диагнозами патологий дыхательных путей (табл.2) (рис.2).

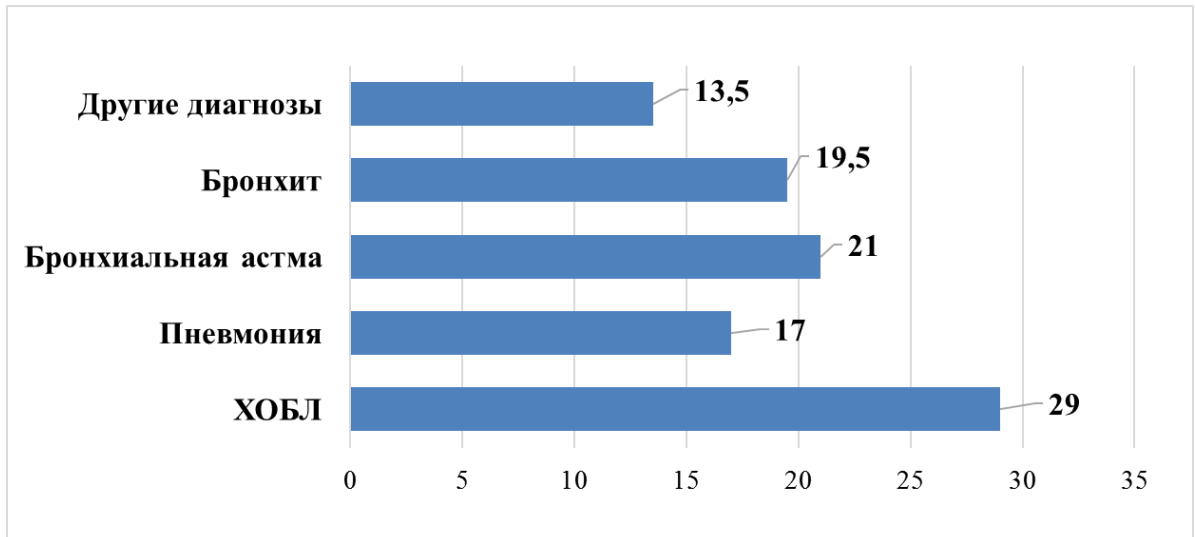


Рисунок 2 – Выборка пациентов с различными патологиями дыхательных путей (в процентах)

Среди исследуемых пациентов у 29% - диагноз ХОБЛ. По сравнению с другими заболеваниями дыхательных путей диагноз ХОБЛ встречается чаще.

В выборке пациентов были 86 мужчин и 83 женщины (рис. 3).

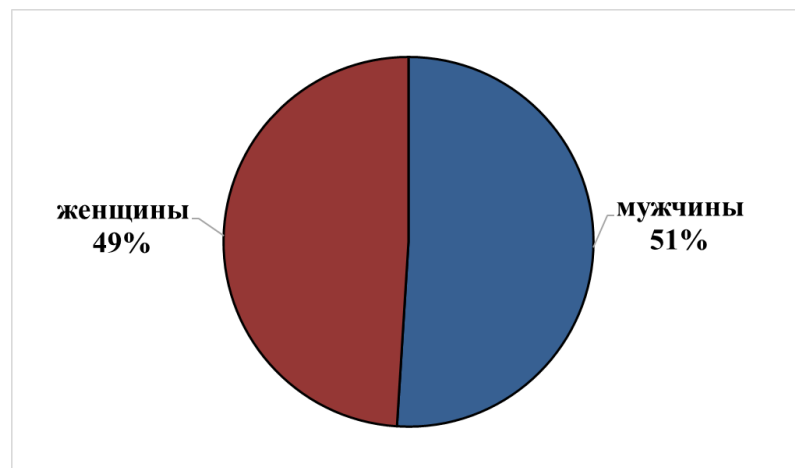


Рисунок 3 – Соотношение количества мужчин и женщин, у которых был взят клинический материал (в процентах)

Таблица 2 – Пациенты, находящиеся на стационарном лечении с различными диагнозами патологий дыхательных путей

№	возраст	пол	№ образца	Диагноз	<i>Mycobacterium spp.</i>	кашель	течение
1	77	Ж	242	ХОБЛ	+	+	среднее

2	75	М	243	Бронхит	—	+	среднее
3	65	Ж	244	Бронх. астма	+	+	среднее
4	68	М	245	Бронхит	—	+	среднее
5	56	Ж	246	Бронх. астма	+	+	среднее
6	54	М	247	Пневмония	—	+	тяжелое
7	69	Ж	248	Бронх. астма	+	+	тяжелое
8	74	Ж	249	Бронх. астма	—	+	среднее
9	58	Ж	250	Пневмония	—	+	среднее
10	65	Ж	251	Бронх. астма	—	+	среднее
11	64	М	252	ХОБЛ	—	+	тяжелое
12	84	М	253	Бронхит	+	+	среднее
13	77	М	254	ХОБЛ	+	+	тяжелое
14	46	Ж	255	Бронхит	—	+	среднее
15	58	М	256	Бронх. астма	+	+	тяжелое
16	76	Ж	257	Бронхит	—	+	среднее
17	78	М	258	ХОБЛ	—	+	тяжелое
18	31	М	259	Саркоидоз	+	+	острое
19	79	Ж	260	Бронх. Астма	+	+	среднее
20	56	Ж	261	Бронх. астма	—	+	среднее
21	61	Ж	262	Пневмония	+	+	среднее
22	77	Ж	263	ХОБЛ	+	+	тяжелое
23	55	М	264	ХОБЛ	+	+	тяжелое
24	60	М	265	ХОБЛ	—	—	тяжелое
25	82	Ж	266	ХОБЛ	—	+	тяжелое
26	77	М	267	Пневмония	—	—	среднее
27	55	Ж	268	Бронх. астма	—	+	тяжелое
28	55	Ж	269	Бронх. астма	—	+	среднее
29	22	М	270	Саркоидоз	—	+	острое
30	73	М	271	Бронх. астма	—	+	тяжелое
31	35	М	272	Абсцесс легкого	—	+	тяжелое
32	36	М	273	Пневмония	+	+	тяжелое
33	74	М	274	ХОБЛ	—	+	обостре ние
34	74	М	275	Бронх. астма	+	+	среднее
35	71	М	276	ХОБЛ	—	+	тяжелое
36	62	Ж	277	Бронх. астма	—	+	среднее
37	28	М	278	Пневмония	+	+	среднее
38	77	Ж	279	Рак	—	+	среднее
39	63	Ж	280	Альвеолит	—	+	среднее
40	49	М	281	Лимфаденопа тия	—	—	среднее
41	59	Ж	282	Пневмония	+	+	среднее

42	80	М	283	ХОБЛ	—	+	тяжелое
43	73	Ж	284	ХОБЛ	—	—	тяжелое
44	80	Ж	285	Бронх. астма	+	+	среднее
45	54	Ж	286	Бронхит	+	+	среднее
46	57	М	287	Бронхит	+	+	среднее
47	58	М	288	Бронх. астма	—	+	среднее
48	56	М	289	Бронх. астма	+	+	тяжелое
49	78	М	290	Пневмония	—	+	тяжелое
50	32	Ж	291	Бронхит	+	+	тяжелое
51	37	Ж	292	Пневмония	—	+	среднее
52	53	Ж	293	Бронхит	—	+	среднее
53	59	М	294	Бронх. астма	—	+	среднее
54	69	Ж	295	Бронхит	—	+	среднее
55	48	Ж	296	Бронх. астма	+	+	среднее
56	58	М	297	Бронх. астма	—	+	тяжелое
57	59	М	298	ХОБЛ	—	+	среднее
58	58	М	299	ХОБЛ	+	+	тяжелое
59	69	Ж	300	Бронх. астма	—	+	среднее
60	83	М	301	Бронхит	—	+	среднее
61	59	М	302	Рак	—	+	среднее
62	76	Ж	303	Бронх. астма	—	+	тяжелое
63	59	М	304	Бронхит	—	+	среднее
64	66	М	305	Бронх. астма	—	+	тяжелое
65	38	Ж	306	Бронхит	—	—	среднее
66	65	Ж	307	ХОБЛ	+	+	тяжелое
67	56	М	308	Пневмония	—	+	среднее
68	27	Ж	309	ОРВИ	—	+	среднее
69	74	Ж	310	Пневмония	—	+	среднее
70	57	Ж	311	Бронх. астма	+	+	тяжелое
71	62	Ж	312	Бронх. астма	—	+	среднее
72	24	М	313	Пневмония	—	+	среднее
73	71	Ж	314	Бронх. астма	—	+	тяжелое
74	84	Ж	315	Пневмония	—	+	среднее
75	72	М	316	ХОБЛ	+	+	тяжелое
76	53	М	317	Бронхит	—	+	среднее
77	53	Ж	318	Плеврит	—	+	среднее
78	23	М	319	Плеврит	—	+	среднее
79	49	Ж	320	Плеврит	—	—	среднее
80	73	Ж	321	ХОБЛ	+	+	среднее
81	62	М	322	Бронх. астма	—	+	тяжелое
82	75	Ж	323	Бронхит	—	+	среднее
83	56	М	324	Пневмония	—	+	среднее
84	59	М	325	ХОБЛ	+	+	тяжелое

85	57	Ж	326	Пневмония	—	+	среднее
86	79	М	327	Бронхит	—	+	среднее
87	77	Ж	328	Бронх. астма	—	+	тяжелое
88	78	М	329	Пневмония	—	+	среднее
89	18	Ж	330	Пневмония	—	+	среднее
90	77	Ж	331	ХОБЛ	+	+	среднее
91	81	М	332	ХОБЛ	—	+	среднее
92	62	М	333	Пневмония	—	+	среднее
93	59	М	334	ХОБЛ	—	+	среднее
94	91	Ж	335	Бронхит	—	+	среднее
95	39	М	336	Бронхит	—	+	среднее
96	30	Ж	337	Бронх. астма	—	+	среднее
97	53	М	338	ХОБЛ	—	+	тяжелое
98	52	М	339	Пневмония	—	+	среднее
99	77	Ж	340	Пневмония	—	+	среднее
100	51	Ж	341	Бронхит	—	+	среднее
101	76	Ж	342	Бронхит	—	+	среднее
102	76	Ж	343	Бронх. астма	—	+	тяжелое
103	39	М	344	ХОБЛ	—	+	тяжелое
104	63	М	345	Бронхит	—	+	среднее
105	63	Ж	346	Пневмония	—	+	среднее
106	68	Ж	347	Плеврит	—	+	среднее
107	42	М	348	Пневмония	—	+	среднее
108	53	Ж	349	ХОБЛ	—	+	тяжелое
109	61	М	350	ХОБЛ	+	—	тяжелое
110	78	Ж	351	Бронхит	—	+	среднее
111	76	М	352	Бронхит	+	+	среднее
112	57	М	353	ХОБЛ	—	+	среднее
113	69	М	354	ХОБЛ	—	+	среднее
114	58	М	355	Бронх. астма	+	+	среднее
115	74	Ж	356	ХОБЛ	+	+	среднее
116	80	М	357	ХОБЛ	+	+	тяжелое
117	53	Ж	358	Бронхит	+	+	среднее
118	50	Ж	359	Бронхит	—	+	среднее
119	63	М	360	ХОБЛ	—	+	среднее
120	41	М	361	ХОБЛ	—	+	тяжелое
121	42	М	362	ХОБЛ	+	+	тяжелое
122	55	М	363	Бронхит	—	+	среднее
123	44	М	364	Бронхит	—	+	среднее
124	57	Ж	365	Бронх. астма	—	+	тяжелое
125	53	М	366	ХОБЛ	—	+	тяжелое
126	37	М	367	ХОБЛ	—	+	тяжелое
127	65	М	368	Бронх. астма	—	+	тяжелое

128	67	Ж	369	ХОБЛ	—	+	среднее
129	43	М	370	Пневмония	—	+	среднее
130	37	Ж	371	Бронхит	+	+	среднее
131	62	Ж	372	Бронх. астма	—	+	среднее
132	85	М	373	ХОБЛ	—	+	тяжелое
133	44	М	374	Пневмония	—	+	среднее
134	32	М	375	Пневмония	—	+	среднее
135	59	Ж	376	ХОБЛ	—	+	среднее
136	56	Ж	377	Пневмония	—	+	среднее
137	64	М	378	ХОБЛ	—	+	тяжелое
138	72	Ж	379	ХОБЛ	—	+	тяжелое
139	76	Ж	380	Бронх. астма	—	+	тяжелое
140	61	М	381	ХОБЛ	—	+	среднее
141	45	М	382	Пневмония	—	+	среднее
142	59	Ж	189	ХОБЛ	—	+	среднее
143	53	М	190	ХОБЛ	—	+	среднее
144	78	Ж	187	ХОБЛ	—	+	тяжелое
145	61	Ж	191	ХОБЛ	—	+	тяжелое
146	33	Ж	31	Пневмония	+	+	среднее
147	67	Ж	29	Плеврит	—	+	среднее
148	39	Ж	30	Бронхит	—	+	среднее
149	58	Ж	28	Пневмония	—	+	среднее
150	36	М	26	Плеврит	—	+	среднее
151	54	М	27	Бронхит	+	+	среднее
152	56	М	39	ХОБЛ	—	+	тяжелое
153	43	Ж	37	Бронх. астма	+	+	среднее
154	63	Ж	38	Бронх. астма	—	+	среднее
155	55	М	34	Бронхит	—	+	среднее
156	70	М	32	ХОБЛ	—	+	тяжелое
157	59	М	40	Бронхит	—	+	среднее
158	65	М	36	Пневмония	—	+	среднее
159	58	Ж	35	Саркоидоз	+	+	тяжелое
160	62	Ж	33	Бронхит	+	+	среднее
161	70	М	232	Бронх. астма	—	+	тяжелое
162	65	М	231	ХОБЛ	—	+	тяжелое
163	69	Ж	230	Альвеолит	+	+	тяжелое
164	88	Ж	235	Бронхит	—	+	среднее
165	66	Ж	238	ХОБЛ	—	+	тяжелое
166	57	М	233	Пневмония	—	+	среднее
167	77	М	234	ХОБЛ	—	+	среднее
168	76	Ж	236	Рак	+	+	среднее
169	58	Ж	237	Бронхит	+	+	среднее

Кроме того, все пациенты относились к различным возрастным группам (рис.4).

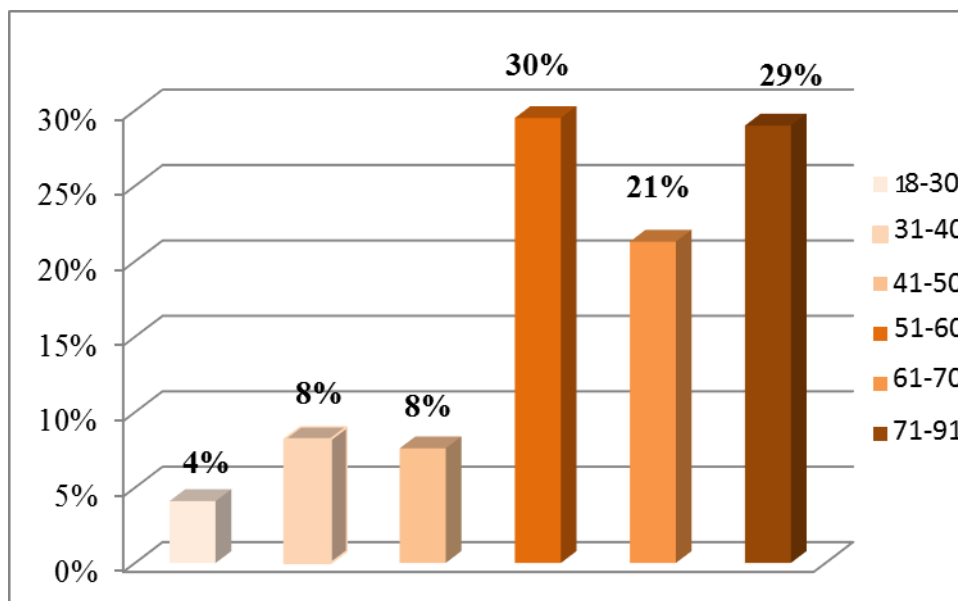


Рисунок 4 – Соотношение возраста и проявления симптомов заболевания дыхательных путей

По диаграмме видно, что проявления симптомов заболевания чаще происходит у людей пожилого возраста: 18-30 лет – 4,1%, 31-40 – 8,2%, 41-50 – 7,6%, 51-60 – 29,5%, 61-70 – 21,5%, 71-91 – 29%. При этом заболевание чаще всего характеризовалось тяжелым клиническим течением.

В ходе исследования был проведен ПЦР-анализ образцов мокроты пациентов с различными патологиями дыхательных путей. При исследовании мокроты для обнаружения *Mycobacterium spp.* использовались праймеры МусF/ МусR (рис.5,6).

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

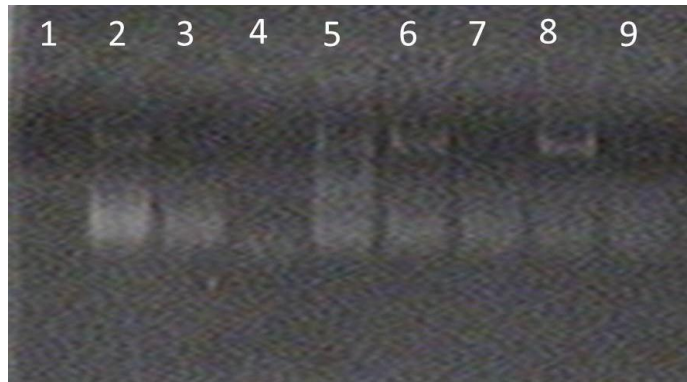


Рисунок 5 – Электрофореграмма результатов амплификации ДНК исследуемых образцов мокроты: 1 – ДНК-отрицательный контрольный образец; 2-9- ДНК исследуемых образцов

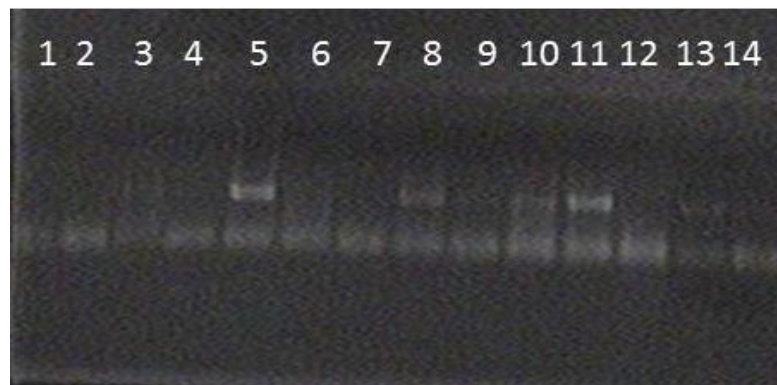


Рисунок 6 – Электрофореграмма результатов амплификации ДНК исследуемых образцов мокроты: 1 – ДНК - отрицательный контрольный образец; 2- 14- ДНК исследуемых образцов

Опытным путем были подобраны условия реакции. Положительный результат наблюдался в 45 случаях (27%) (рис.7).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что *Mycobacterium spp.* встречается у 27% пациентов с патологиями дыхательных путей. При этом из 49 пациентов с диагнозом ХОБЛ, лишь у 14 человек (28,6%) были обнаружены *Mycobacterium spp.* (рис.8).

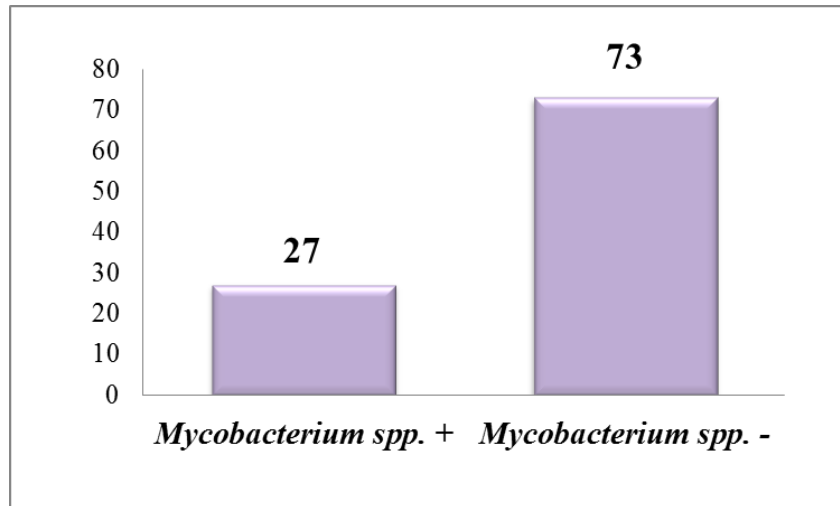


Рисунок 7 – Наличие ДНК бактерий *Mycobacterium spp.* в клиническом материале пациентов с различными патологиями дыхательных путей (в процентах)

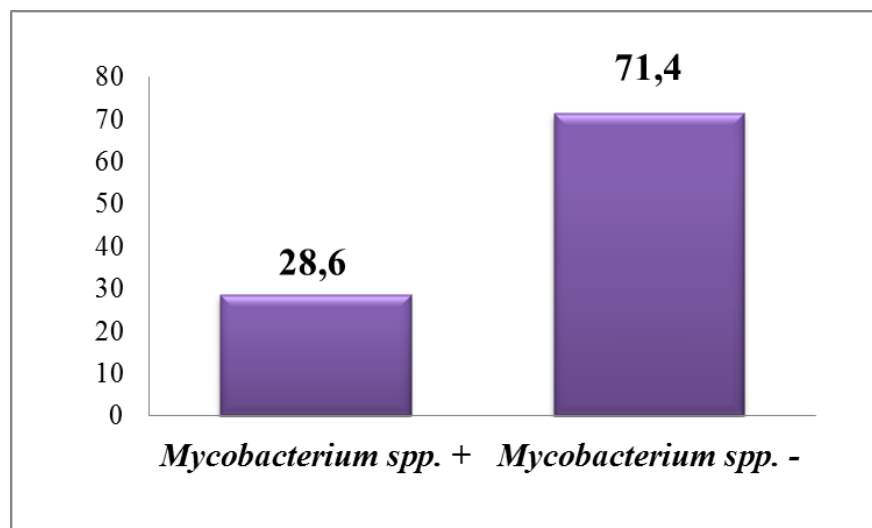


Рисунок 8 – Наличие ДНК бактерий *Mycobacterium spp.* в клиническом материале пациентов с диагнозом ХОБЛ (в процентах)

3.3. Исследование показателей анализа крови

В ходе исследования были проверены показатели крови: эритроциты, гемоглобин, лейкоциты (табл.3).

Таблица 3 – Показатели анализа крови.

№	возраст	пол	№ образца	диагноз	Эритроц. 10*12/л	Нв г/л	Лейк. 10*9/л
1	77	Ж	242	ХОБЛ	4,7	139	4,2
2	75	М	243	Бронхит	4,0	112	4,4
3	65	Ж	244	Бронх. астма	4,6	124	7,9
4	68	М	245	Бронхит	3,4	102	9,8
5	56	Ж	246	Бронх. астма	4,4	134	5,3
6	54	М	247	Пневмония	4,5	147	4,7
7	69	Ж	248	Бронх. астма	3,5	143	8,6
8	74	Ж	249	Бронх. астма	4,3	141	8,0
9	58	Ж	250	Пневмония	4,2	140	4,8
10	65	Ж	251	Бронх. астма	4,4	139	10,7
11	64	М	252	ХОБЛ	4,4	118	4,8
12	84	М	253	Бронхит	5,2	142	3,7
13	77	М	254	ХОБЛ	4,7	140	14,2
14	46	Ж	255	Бронхит	4,4	144	5,1
15	58	М	256	Бронх. астма	4,8	144	5,6
16	76	Ж	257	Бронхит	4,5	134	7,8
17	78	М	258	ХОБЛ	4,8	147	13,0
18	31	М	259	Саркоидоз	4,2	127	7,2
19	79	Ж	260	Бронх. астма	4,0	128	7,2
20	56	Ж	261	Бронх. астма	4,5	143	12,3
21	61	Ж	262	Пневмония	4,4	119	7,9
22	77	Ж	263	ХОБЛ	4,8	136	9,9
23	55	М	264	ХОБЛ	4,4	126	6,3
24	60	М	265	ХОБЛ	4,0	120	8,4
25	82	Ж	266	ХОБЛ	4,4	116	4,1
26	77	М	267	Пневмония	4,9	165	7,5
27	55	Ж	268	Бронх. астма	4,0	128	11,0
28	55	Ж	269	Бронх. астма	4,8	143	8,0
29	22	М	270	Саркоидоз	3,8	121	5,8
30	73	М	271	Бронх. астма	4,2	121	4,3
31	35	М	272	Абсцесс легкого	4,2	112	11,6
32	36	М	273	Пневмония	3,7	115	6,0
33	74	М	274	ХОБЛ	5,5	160	15,4
34	74	М	275	Бронх. астма	3,5	120	10,7
35	71	М	276	ХОБЛ	4,5	137	5,6
36	62	Ж	277	Бронх. астма	3,6	134	4,9
37	28	М	278	Пневмония	4,2	123	4,0

38	77	Ж	279	Рак	4,3	106	17,1
39	63	Ж	280	Альвеолит	3,9	119	6,2
40	49	М	281	ХОБЛ	4,8	140	5,7
41	59	Ж	282	Пневмония	4,1	123	6,8
42	80	М	283	ХОБЛ	4,9	148	15,7
43	73	Ж	284	Бронх. астма	4,4	141	9,5
44	80	Ж	285	Бронх. астма	4,5	136	9,0
45	54	Ж	286	Бронхит	4,2	122	6,0
46	57	М	287	Бронхит	4,0	139	4,0
47	58	М	288	Бронх. астма	4,3	131	7,0
48	56	М	289	Бронх. астма	4,9	163	10,4
49	78	М	290	Пневмония	4,7	111	7,0
50	32	Ж	291	Бронхит	4,3	127	8,0
51	37	Ж	292	Пневмония	3,9	130	7,0
52	53	Ж	293	Бронхит	4,4	140	5,9
53	59	М	294	Бронх. астма	4,4	148	7,9
54	69	Ж	295	Бронхит	4,1	138	8,4
55	48	Ж	296	Бронх. астма	4,9	130	8,8
56	58	М	297	Бронх. астма	3,8	113	10,9
57	59	М	298	ХОБЛ	4,5	134	6,6
58	58	М	299	ХОБЛ	5,1	145	8,4
59	69	Ж	300	Бронх. астма	5,1	152	8,6
60	83	М	301	Бронхит	4,9	147	8,5
61	59	М	302	Рак	4,2	128	5,0
62	76	Ж	303	Бронх. астма	4,7	138	9,9
63	59	М	304	Бронхит	4,1	124	6,5
64	66	М	305	Бронх. астма	4,4	133	7,2
65	38	Ж	306	Бронхит	4,1	112	11,3
66	65	Ж	307	ХОБЛ	3,7	114	13,4
67	56	М	308	Пневмония	3,5	118	6,5
68	27	Ж	309	ОРВИ	3,5	116	9,0
69	74	Ж	310	Пневмония	4,0	142	9,8
70	57	Ж	311	Бронх. астма	5,0	98	10,8
71	62	Ж	312	Бронх. астма	3,4	118	4,4
72	24	М	313	Пневмония	4,7	134	6,1
73	71	Ж	314	Бронх. астма	4,2	125	4,3
74	84	Ж	315	Пневмония	4,9	139	4,4
75	72	М	316	ХОБЛ	4,9	142	7,3
76	53	М	317	Бронхит	4,8	146	10,1
77	53	Ж	318	Плеврит	4,8	148	3,2
78	23	М	319	Плеврит	2,9	70	10,8
79	49	Ж	320	Плеврит	4,1	116	7,4
80	73	Ж	321	ХОБЛ	4,9	139	14,4

81	62	М	322	Бронх. астма	4,9	147	5,7
82	75	Ж	323	Бронхит	5,2	157	10,0
83	56	М	324	Пневмония	4,2	126	5,0
84	59	М	325	ХОБЛ	4,5	139	4,0
85	57	Ж	326	Пневмония	4,0	119	6,8
86	79	М	327	Бронхит	4,8	147	4,4
87	77	Ж	328	Бронх. астма	3,5	91	9,3
88	78	М	329	Пневмония	3,6	108	8,0
89	18	Ж	330	Пневмония	3,0	119	6,8
90	77	Ж	331	ХОБЛ	4,2	126	5,0
91	81	М	332	ХОБЛ	4,8	148	3,2
92	62	М	333	Пневмония	3,5	105	10,1
93	59	М	334	ХОБЛ	4,4	139	10,7
94	91	Ж	335	Бронхит	4,8	142	7,2
95	39	М	336	Бронхит	4,5	135	6,6
96	30	Ж	337	Бронх. астма	4,8	141	7,2
97	53	М	338	ХОБЛ	4,1	122	9,2
98	52	М	339	Пневмония	4,4	126	6,3
99	77	Ж	340	Пневмония	3,5	97	6,0
100	51	Ж	341	Бронхит	4,6	129	6,9
101	76	Ж	342	Бронхит	3,8	116	4,5
102	76	Ж	343	Бронх. астма	4,4	120	9,1
103	39	М	344	ХОБЛ	3,5	143	8,6
104	63	М	345	Бронхит	4,0	132	5,5
105	63	Ж	346	Пневмония	5,0	143	8,4
106	68	Ж	347	Плеврит	4,5	129	4,7
107	42	М	348	Пневмония	4,6	142	9,6
108	53	Ж	349	ХОБЛ	5,0	152	13,6
109	61	М	350	ХОБЛ	4,4	148	7,9
110	78	М	351	Бронхит	5,2	159	12,4
111	76	М	352	Бронхит	3,9	117	6,6
112	57	М	353	ХОБЛ	5,1	152	8,6
113	69	М	354	ХОБЛ	3,5	105	10,1
114	58	М	355	Бронх. астма	3,6	107	6,3
115	74	Ж	356	ХОБЛ	3,8	117	10,3
116	80	М	357	ХОБЛ	4,3	133	13,5
117	53	Ж	358	Бронхит	4,0	121	8,4
118	50	Ж	359	Бронхит	4,4	140	13,4
119	63	М	360	ХОБЛ	4,7	141	6,5
120	41	М	361	ХОБЛ	4,1	122	9,6
121	42	М	362	ХОБЛ	4,5	121	14,1
122	55	М	363	Бронхит	5,3	162	9,8
123	44	М	364	Бронхит	4,9	150	11,4

124	57	Ж	365	Бронх. астма	5,0	140	6,3
125	53	М	366	ХОБЛ	4,1	122	9,2
126	37	М	367	ХОБЛ	4,6	142	9,6
127	65	М	368	Бронх. астма	5,1	153	9,2
128	67	Ж	369	ХОБЛ	4,3	128	8,6
129	43	М	370	Пневмония	4,6	138	7,1
130	37	Ж	371	Бронхит	4,5	137	9,5
131	62	Ж	372	Бронх. астма	3,7	115	10,1
132	85	М	373	ХОБЛ	4,5	121	14,1
133	44	М	374	Пневмония	4,4	123	10,7
134	32	М	375	Пневмония	4,6	135	6,8
135	59	Ж	376	ХОБЛ	3,8	115	7,4
136	56	Ж	377	Пневмония	4,5	128	6,9
137	64	М	378	ХОБЛ	4,6	142	8,0
138	72	Ж	379	ХОБЛ	5,2	148	4,0
139	76	Ж	380	Бронх. астма	3,9	118	8,8
140	61	М	381	ХОБЛ	5,0	140	6,3
141	45	М	382	Пневмония	4,4	134	8,0
142	59	Ж	189	ХОБЛ	4,9	148	5,7
143	53	М	190	ХОБЛ	2,9	80	9,4
144	78	Ж	187	ХОБЛ	3,6	104	3,8
145	61	Ж	191	ХОБЛ	4,2	123	14,4
146	33	Ж	31	Пневмония	4,9	119	10,8
147	67	Ж	29	Плеврит	4,5	128	7,6
148	39	Ж	30	Бронхит	4,9	138	9,1
149	58	Ж	28	Пневмония	4,8	136	9,9
150	36	М	26	Плеврит	3,4	106	5,8
151	54	М	27	Бронхит	3,6	109	8,5
152	56	М	39	ХОБЛ	4,6	134	6,2
153	43	Ж	37	Бронх. астма	4,0	120	3,6
154	63	Ж	38	Бронх. астма	4,1	122	9,5
155	55	М	34	Бронхит	4,3	132	5,9
156	70	М	32	ХОБЛ	3,7	108	4,0
157	59	М	40	Бронхит	4,1	124	8,7
158	65	М	36	Пневмония	4,6	138	7,0
159	58	Ж	35	Саркоидоз	4,0	115	8,4
160	62	Ж	33	Бронхит	5,3	156	12,6
161	70	М	232	Бронх. астма	3,7	110	12,7
162	65	М	231	ХОБЛ	4,7	139	10,3
163	69	Ж	230	Альвеолит	4,3	115	10,6
164	88	Ж	235	Бронхит	4,5	136	9,2
165	66	Ж	238	ХОБЛ	3,6	100	8,1
166	57	М	233	Пневмония	4,7	142	12,2

167	77	М	234	ХОБЛ	3,5	118	5,5
168	76	Ж	236	Рак	4,4	129	7,9
169	58	Ж	237	Бронхит	4,6	147	9.1

При оценке показателей анализа крови у больных были получены следующие данные.

Большинство больных (98 из 169 чел. — 58%) имеют нормальный уровень эритроцитов, у 49 человек (29%) уровень эритроцитов ниже нормы, а у 9 человек (14,2%) – выше нормы.

Большинство больных (89 чел. – 52,6%) имеют нормальный уровень гемоглобина, у 62 человека (36,6%) уровень гемоглобина ниже нормы, а у 18 человек (10,6%) – выше нормы.

Большинство больных (104 чел. – 61,5%) имеют нормальный уровень лейкоцитов, у 60 человек (35,5%) уровень лейкоцитов выше нормы, а у 5 человек (3%) – ниже нормы.

После детекции *Mycobacterium spp.* в клиническом материале при помощи ПЦР-анализа были сравнены показатели эритроцитов у пациентов с положительным результатом. Статистически значимой разницы значений между показателями пациентов с микобактериозом и без не было (рис.9).

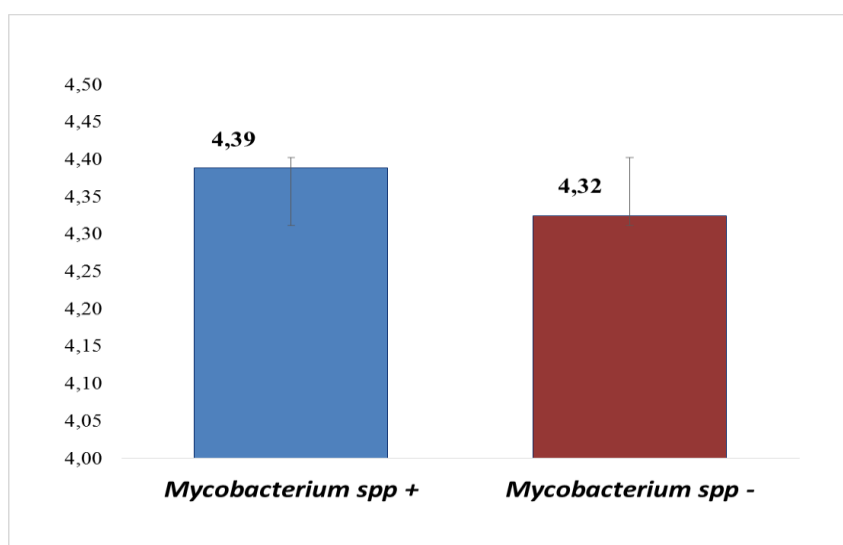


Рисунок 9 – Показатели эритроцитов у пациентов с положительным и отрицательным результатом на *Mycobacterium spp.* (10*12/л)

Кроме того, были сравнены показатели лейкоцитов (рис.10) и гемоглобина (рис.11). Также статистически значимой разницы значений между показателями не было.

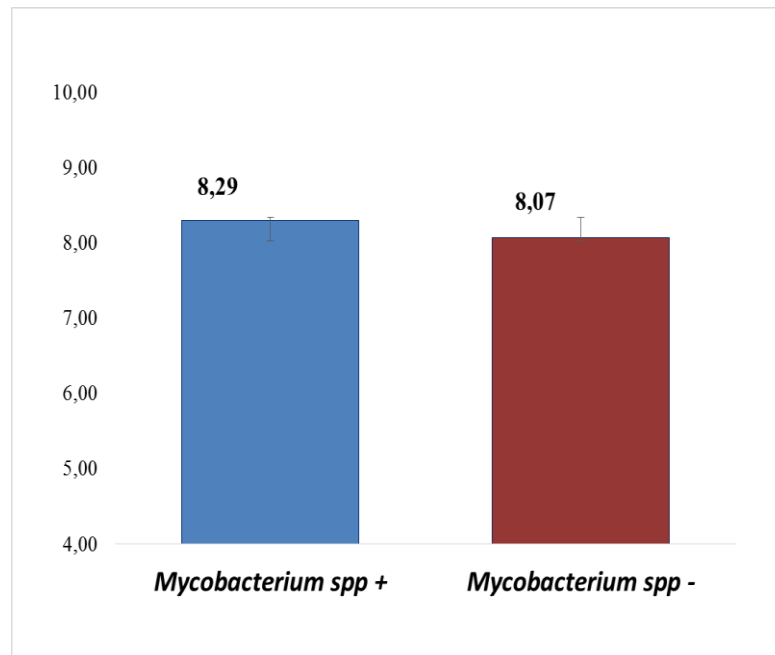


Рисунок 10 – Показатели лейкоцитов у пациентов с положительным и отрицательным результатом на *Mycobacterium spp.* (10*9/л)

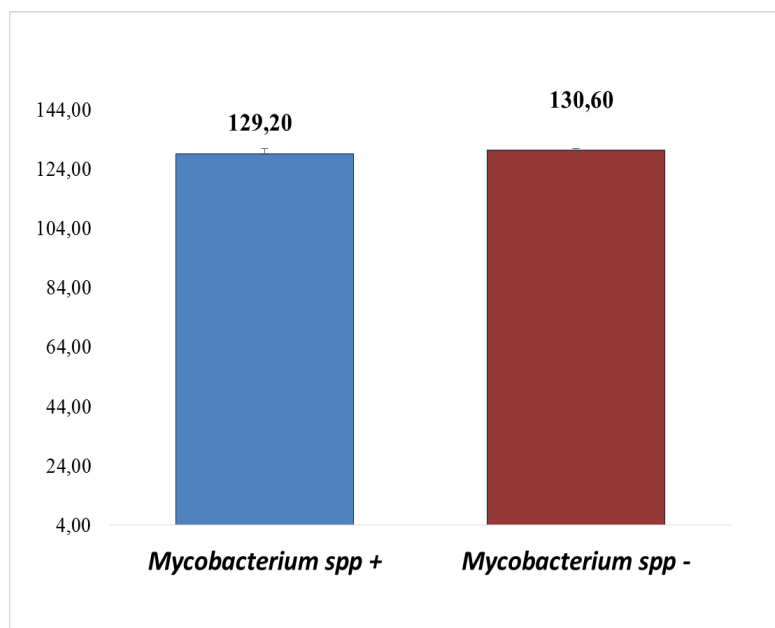


Рисунок 11 – Показатели гемоглобина у пациентов с положительным и отрицательным результатом на *Mycobacterium spp.*

В результате сравнения основных показателей крови выяснилось, что статистически значимой разницы между значениями не было. Отсюда можно сделать вывод о том, что, анализируя общий анализ крови у пациентов с патологиями дыхательных путей, нельзя делать какие-либо различия между пациентами с микобактериозами и без.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование ДНК, выделенной из образцов клинического материала (мокроты), показало, что ПЦР-анализ является высокоспецифичными и чувствительными, что является важным фактором при лабораторной диагностике, а подобранные родоспецифичные праймеры действительно обладают высокой специфичностью и могут применяться при исследовании клинического материала на наличие бактерий рода *Mycobacterium*.

Как было показано, при диагностике микобактериозов нельзя опираться на данные показателей крови, так как статистически значимой разницы между значениями у пациентов с патологиями дыхательных путей нет. Кроме того, все эти показатели практически находились в пределах нормы.

ПЦР - диагностика при ХОБЛ обладает рядом преимуществ: высокой и регулируемой специфичностью, высокой чувствительностью, возможностью идентификации возбудителя в течение нескольких часов, не требует специальных условий доставки и хранения материала.

ВЫВОДЫ

1. В ходе работы был отобран клинический материал от 169 больных с различными патологиями дыхательных путей, в том числе с диагнозом хроническая обструктивная болезнь легких.
2. Среди заболеваний дыхательных путей диагноз ХОБЛ встречается чаще.
3. Выделена ДНК с клинического материала набором «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ».
4. Проведен ПЦР-анализ с родоспецифичными праймерами.
5. Исследование мокроты на ДНК бактерий рода *Mycobacterium spp.* выявило наличие микобактериоза у 29% пациентов с различными патологиями дыхательных путей и у 28,6% с диагнозом ХОБЛ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.Авдеев С.Н. Антибактериальная терапия при обострении ХОБЛ: что необходимо знать терапевту? Болезни органов дыхания. – 2009. – том 1: стр. 39-47.
- 2.Авдеев С.Н. Выбор фиксированных комбинаций (ингаляционных кортикостероидов и бета-агонистов длительного действия) при хронической обструктивной болезни легких. – 2013.–№5. – стр. 70-80.
- 3.Авдеев С.Н. Значение обострений для пациентов с ХОБЛ // Эффективная фармакотерапия. Пульмонология и оториноларингология. – 2014. – № 2. – стр.29.
- 4.Вишневский Б.И., Маничева О.А, Щеголева Р.А., Оттен Т.Ф.. Вирулентность потенциально патогенных нетуберкулезных микобактерий. Обзор. – 2015. – стр. 5-14.
- 5.Малеев В.В., Селькова Е.П., Простяков И.В., Осипова Е.А. Фармакоэпидемиологическое исследование течения гриппа и других ОРВИ в сезоне 2010/11 гг. – 2011.
- 6.Отева С. Ю., Полонская Д. Е. Встречаемость нетуберкулезных микобактерий у населения г. Красноярск // Вестник КрасГАУ. – 2013. – №7. – стр. 180
- 7.Оттен Т.Ф., Васильев А.В. Микобактериоз. – СПб., 2005. – стр. 224.
- 8.Суркова Л.К., Скрягина Е.М., Залуцкая О.М., Борисенко Т.Д., Кралько В.Я. Микобактериозы легких: критерии диагностики в современных условиях // Смоленский медицинский альманах. 2015. – №3. – стр. 146
- 9.Трухан Д.И., Викторова И.А. Болезни органов дыхания. – СПб., 2013. – стр. 30.
- 10.Федосенко С.В., Огородова Л.М., Карнаушкина М.А., Куликов Е.С., Деев И.А., Кириллова Н.А. Роль сообщества микроорганизмов дыхательных путей в патогенезе ХОБЛ. – 2014. – стр.153-157.

- 11.Чучалин А.Г. Глобальная инициатива по Хронической Обструктивной Болезни Легких (GOLD).– М.,«Атмосфера». – 2003. – стр. 96.
- 12.Шмелев Е.И. Диагностика хронической обструктивной болезни легких: Рекомендации для врачей. – М. – 2003. – стр.10.
- 13.Beck J.M., Young V.B., Huffnagle G.B. The microbiome of the lung // Transl. Res. – 2012. – 160 (4). – P. 258–266.
- 14.Berger G, Wunderink RG. Lung microbiota: genuine or artifact? Isr Med Assoc J. – 2013;15:731–3.
- 15.Bilde L., Rud Svenning A., Dollerup J. The cost of treating patients with COPD in Denmark – A population study of COPD patients compared with non-COPD controls. – Respir Med. – 2007;101(3):539–546.
- 16.Butler WR,Guthertz LS. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of Mycobacterium species. ClinMicrobiolRev. – 2001;14(4):704-26
- 17.Centers for Disease Control and Prevention. Updated guide lines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. Morb Mortal Wkly Rep 2009; 58:7-10.
18. Vergnolle, O., Chavadi, S.S., Edupuganti, U.R., Mohandas, P., Chan, C., Zeng, J., Kopylov, M., Angelo, N.G., Warren, J.D., Soll, C.E. and Quadri, L.E. Biosynthesis of cell envelope-associated phenolic glycolipids in Mycobacterium marinum. J. Bacteriol. – 2015. – p.1040-1050.
- 19.Quadri L.E. Inactivation of tesA reduces cell wall lipid production and increases drug susceptibility in mycobacteria // J. Biol. Chem. — 2011. — Vol. 286, N 28. — P. 24616–24625.
- 20.Dickson RP, Huffnagle GB. The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease. – PLoS Pathog 11(7). – 2015.
- 21.Engler K, Muhlemann K, Garzoni C, Pfahler H., Geiser T., and C. Von Garnier. Colonisation with Pseudomonas aeruginosa and antibiotic resistance patterns in COPD patients. – Swiss Medical Weekly. – vol. 142, no. 1. – 2012.

22.Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, Young VB, Toews GB, Curtis JL, Sundaram B, Martinez FJ, Huffnagle GB.. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. – PLoS One 2011.

23.Falkinham J. Mycobacterial aerosols and respiratory diseases // Emerg. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 9. – P. 763-767.

24.Falkinham J.O. Nontuberculous mycobacteria in the environment. // Clin Chest Med. 2002. – Vol.23. – P.529-551.

25.Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. – 2011.

26.González-Pérez M., Mariño-Ramírez L., Parra-López C.A., Murcia M.I., Marquina B., Mata-Espinoza D., Rodriguez-Míguez Y., Baay-Guzman G.J., Huerta-Yepez S., Hernandez-Pando R. Virulence and immune response induced by Mycobacterium avium complex strains in a model of progressive pulmonary tuberculosis and subcutaneous infection in BALB/c mice // Infect. Immun. — 2013. — Vol. 81, N 11. — P. 4001–4012

27.Govan J.R.W., Brown A.R., Jones A.M. Evolving epidemiology of Pseudomonas aeruginosa and the Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis lung infection. – Future Microbiol 2: p.153-164. – 2007.

28.Gray TJ, Kong F, Jelfs P, Sintchenko V, Chen SC. Improved identification of rapidly growing mycobacteria by a 16S-23S internal transcribed spacer region PCR and capillary gel electrophoresis. PLoS One. – 2014. – 9(7).

29.Guirado E., Arcos J., Knaup R., Reeder R., Betz B., Cotton C., Patel T., Pfaller S., Torrelles J.B., Schlesinger L.S. Characterization of clinical and environmental Mycobacterium avium spp. Isolates and their interaction with human macrophages // PLoS One. — 2012. — Vol. 7, N9.

30. Joshi S.A.1, Ball D.A., Sun M.G., Carlsson F., Watkins B.Y., Aggarwal N., McCracken J.M., Huynh K.K., Brown E.J. EccA, a component of the Mycobacterium marinum ESX-1 protein virulence factor secretion pathway,

regulates mycolic acid lipid synthesis // Chem Biol. — 2012. — Vol. 23, N 3. — P. 372–380.

31. Julián E., Roldán M., Sánchez-Chardi A., Astola O., Agustí G., Luquin M. Microscopic Cords, a Virulence-Related Characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, Are Also Present in Nonpathogenic *Mycobacteria* // J. Bacteriol. — 2010. — Vol. 192, N 7. — P. 1751–1760.

32. Käser M., Hauser J., Small P., Pluschke G. Large sequence polymorphisms unveil the phylogenetic relationship of environmental and pathogenic mycobacteria related to *Mycobacterium ulcerans* // Appl. Environ. Microbiol. — 2009. — Vol. 75, N 17. — P. 5667–5675.

33. Kennedy G.M., Hooley G.C., Champion M.M., Mba Medie F., Champion P.A. A novel ESX-1 locus reveals that surface-associated ESX-1 substrates mediate virulence in *Mycobacterium marinum* // J. Bacteriol. — 2014. — Vol. 196, N 10. — P. 1877–1888.

34. Kim K.H., Kim T.S., Lee J.G., Park J.K., Yang M., Kim J.M., Jo E.K., Yuk J.M. Characterization of Proinflammatory Responses and Innate Signaling Activation in Macrophages Infected with *Mycobacterium scrofulaceum* // Immune Netw. — 2014. — Vol. 14, N 6. — P. 307–320.

35. M. M. Johnson, J. A. Odell. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infection // J Thorac Dis. — 2014. — 6(3). — p. 210-20.

36. Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. — 2015. — p. 1–2571.

37. Mehdi Mirsaeidi, Roberto F. Machado, Joe G. N. Garcia, Dean E. Schraufnagel. Nontuberculous mycobacterial disease mortality in the United States, 1999–2010: a population-based comparative study. — PLoS ONE. — vol. 9. — no. 3. — 2014.

38. Murphy T.F., Brauer A.L., Eschberger K., Lobbins P., Grove L., Cai X., Sethi S. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2008. — 177(8). — P. 853-860.

39. Nakazawa A., Hagiwara E., Ikeda S., Oda T., Komatsu S., Ogura T. A case of pulmonary *Mycobacterium gordonae* infection diagnosed by gastric juice

culture and successfully treated with multidrug chemotherapy // *Kekkaku*. — 2012. — Vol. 87, N 11. — P. 727–731.

40. Orme I.M., Ordwa D.J. Host response to nontuberculous mycobacterial infections of current clinical importance // *Infect. Immun.* — 2014. — Vol. 82, N 9. — P. 3516–3522.

41. Papi A., Bellettato C.M., Braccioni F, et al. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2006. – 173: 1114–1121.

42. Park I.K., Hsu A.P., Tettelin H., Shallom S.J., Drake S.K., Ding L., Wu U.I., Adamo N., Prevots D.R., Olivier K.N., Holland S.M., Sampaio E.P., Zelazny A.M. Clonal Diversification and Changes in Lipid Traits and Colony Morphology in *Mycobacterium abscessus* Clinical Isolates // *J. Clin. Microbiol.* — 2015. — Vol. 53, N 11. — P. 3438–3447.

43. Pauls, R.J., Turenne, C.Y., Wolfe, J.N., and Kabani, A. A high proportion of novel mycobacteria species identified by 16S rDNA analysis among slowly growing AccuProbe-negative strains in a clinical setting. *Am. J. Clin. Pathol.* 120(4): 560–566. – 2003.

44. Prevots DR, Shaw PA, Strickland D, Jackson LA, Raebel MA, Blosky MA, Montes de Oca R, Shea YR, Seitz AE, Holland SM, Olivier KN. Nontuberculous mycobacterial lung disease prevalence at four integrated health care delivery systems. – *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2010. - vol. 182, no. 7, pp. 970–976.

45. Rahman S.A., Singh Y., Kohli S., Ahmad J., Ehtesham N.Z., Tyagi A.K., Hasnain S.E. Comparative analyses of nonpathogenic, opportunistic, and totally pathogenic mycobacteria reveal genomic and biochemical variabilities and highlight the survival attributes of *Mycobacterium tuberculosis* // *MBio*. — 2014. — Vol. 4, N 5(6).

46. Rakhimova E., Wiehlmann L., Brauer A.L., Sethi S., Murphy T.F., Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* population biology in chronic obstructive pulmonary disease // *J. Infect. Dis.* – 2009. – 200 (12). – P. 1928–1935.

47.S. Christianson, J. Wolfe, H. Soualhine, and M. K. Sharma. Comparison of repetitive-sequence-based polymerase chain reaction with random amplified polymorphic DNA analysis for rapid genotyping of nontuberculosis mycobacteria. *J. Microbiol.* – 2012. – p. 954.

48.Sawahata M., Hagiwara E., Ogura T., Komatsu S., Sekine A., Tsuchiya N., Takahashi H. Pulmonary mycobacteriosis caused by *Mycobacterium peregrinum* in a young, healthy man // *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi.* — 2010. — Vol. 48, N 11. — P. 866–870.

49. Sethi S., Evans N., Grant BJB., Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.*– 2002. – 347: 465–71.

50. Sethi S., Murphy T.F. Review Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* – 2008. – 359 (22). – p. 2355–2365.

51.Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, Elliott WM, McDonough JE, et al.The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. – *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2012.

52.Sze MA, Dimitriu PA, Suzuki M, McDonough JE, Campbell JD, Brothers JF, et al. Host response to the lung microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. – *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2015.

53. Thibault, V.C., Grayon, M., Boschioli, M.L., Hubbans, C., Overduin, P., Stevenson, K., et al. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* sub sp.paratuberculosis and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. – *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – 45(8): 2404–2410.

54. Thibault, V.C., Grayon, M., Boschioli, M.L., Willery, E., Allix-Beguec, C., Stevenson, K., et al. Combined multilocus shortsequence-repeat and mycobacterial interspersed repetitive unitvariable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium avium* subsp.paratuberculosis isolates. – *J. Clin. Microbiol.* – 2008. – 46(12).

- 55.Uchiya K., Takahashi H., Nakagawa T., Yagi T., Moriyama M., Inagaki T, Ichikawa K., Nikai T., Ogawa K. Characterization of a novel plasmid, pMAH135, from *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* // PLoS One. — 2015. — Vol. 10, N 2.
- 56.Van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections // Semin Respir Crit. Care. Med. — 2013. — Vol. 34, N 1. — P. 103–109.
- 57.Veeramachaneni S.B., Sethi S. Pathogenesis of bacterial exacerbations of COPD. COPD. — 2006. — P.109–115.
- 58.Vergnolle O., Chavadi S.S., Edupuganti U.R., Mohandas P., Chan C., Zeng J., Kopylov M., Angelo N.G., Warren J.D., Soll C.E., Quadri L.E. Biosynthesis of cell envelope-associated phenolic glycolipids in *Mycobacterium marinum* // J. Bacteriol. — 2015. — Vol. 197, N 6. — P. 1040–1050.
- 59.V. Beasley, P.V. Joshi, A. Singanayagam, P. L. Molyneaux, S. Johnston, P. Mallia. Lung microbiology and exacerbations in COPD. - International Journal of COPD. — 2012. — №7. — p. 555-559.
60. White AJ., Gompertz S., Stockley RA. Chronic obstructive pulmonary disease. The aetiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Thorax. — 2003. — P. 73–80.
- 61.Willner D, Haynes MR, Furlan M, Schmieder R, Lim YW, et al . Spatial distribution of microbial communities in the cystic fibrosis lung. — 2011.
62. Wilson D.N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. — Nat. Rev. Microbiol. — 2014. — 12: p.35– 48.
- 63.Winthrop KL, McNelley E, Kendall B, Marshall-Olson A, Morris C, et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease. — Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2010. — 182: p. 977–982.

ПРИЛОЖЕНИЯ



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

СЕРТИФИКАТ

УЧАСТНИКА (ЦЫ) Ивановой Светланы Сергеевны

82-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых

«Вопросы теоретический и практической медицины»

г. Уфа, 24 апреля 2017 г.



Ректор БГМУ

В.Н.Павлов

ОТЗЫВ

научного руководителя на выпускную квалификационную (дипломную) работу студентки 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. – «Биология» медико-профилактического факультета с отделением микробиологии **Ивановой Светланы Сергеевны** на тему «Частота встречаемости нетуберкулезных микобактерий при хронической обструктивной болезни легких».

Дипломная работа Ивановой Светланы Сергеевны посвящена изучению частоты встречаемости микобактерий при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Работа выполнена с использованием теоретических основ микробиологии. Анализ данных исследования проведен комплексно с применением необходимых практических навыков. Практическая часть работы выполнена самостоятельно. В работе исследованы предоставленные клинические образцы, а также методы: ПЦР-анализ, детекция ПЦР-продуктов методом агарозного гель-электрофореза.

За время выполнения выпускной квалификационной работы Иванова С.С. зарекомендовала себя как работоспособный студент, имеющий достаточную теоретическую подготовку и стремящийся к развитию.

Иванова С.С. является 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 **Ивановой Светланы Сергеевны** на тему «Частота встречаемости нетуберкулезных микобактерий при хронической обструктивной болезни легких».

Выпускная квалификационная работа выполнена на актуальную тему, поскольку микобактериозы легких получили в последние годы известность в связи с улучшением лабораторных методов выделения и идентификации нетуберкулезных микобактерий. Диагностика микобактериоза остается сложной проблемой, так как большая часть нетуберкулезных микобактерий является условно-патогенной и до настоящего времени не разработаны методы постановки диагноза и подходы к лечению этого заболевания

Ивановой С.С. обработано большое количество научного материала, на высоком теоретическом и методологическом уровне проведено исследование проблем диагностики ХОБЛ. Материал в выпускной квалификационной работе логически структурирован, написан научным стилем изложения.

К положительным сторонам данной работы следует отнести комплексный анализ частоты встречаемости микобактерий при ХОБЛ, указания не только проблем диагностики нетуберкулезных микобактерий, но и проведение сравнительной характеристики информативности тест-системы для обнаружения нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале.

Ивановой С.С. опубликовано 2 научные работы, что является хорошим показателем для студента-бакалавра.

Проведенное Ивановой С.С. исследование свидетельствует о том, что автор в достаточной мере владеет методами научного анализа и обладает достаточно высоким уровнем подготовленности к проведению научных работ.

Рецензент:

Научный сотрудник

ФГБУН Института биохимии и генетики

Уфимского научного центра РАН,

кандидат биологических наук

для документов

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

Д.К. Благова

20.06.2017

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу обучающегося 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. Биология **Ивановой Светланы Сергеевны** на тему «Частота встречаемости нетуберкулезных микобактерий при хронической обструктивной болезни легких».


Выпускная квалификационная работа выполнена на актуальную тему, поскольку диагностика микобактерий остается сложной проблемой и до настоящего времени не разработаны методы постановки диагноза и подходы к лечению этого заболевания.

Ивановой С.С. обработано большое количество научного материала, на высоком теоретическом и методологическом уровне проведено исследование проблем диагностики ХОБЛ. Материал в выпускной квалификационной работе логически структурирован, написан научным стилем изложения.

К положительным сторонам данной работы следует отнести комплексный анализ частоты встречаемости микобактерий при ХОБЛ, указания не только проблем диагностики нетуберкулезных микобактерий, но и проведение сравнительной характеристики информативности тест-системы для обнаружения нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале.

Сформулированные в работе выводы достаточно обоснованы и могут быть использованы в практической деятельности. Существенных недостатков в выпускной квалификационной работе не выявлено.

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


(подпись)

Б.Р. Кулуев

«20» июня 2017 г.



ВСЕРОССИЙСКАЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ИННОВАЦИИ В МЕДИЦИНСКОЙ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ, ВЕТЕРИНАРНОЙ И ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

*К 135-летию со дня рождения
академика В.М. Аристовского*

*Под редакцией профессора В.Б. Сбойчакова
и доктора медицинских наук В.В. Мальшиева*

МАТЕРИАЛЫ

30-31 марта 2017 года



Санкт-Петербург
2017

Научное издание

Всероссийская научно-практическая конференция
**ИННОВАЦИИ В МЕДИЦИНСКОЙ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ,
ВЕТЕРИНАРНОЙ И ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ**

*Под редакцией профессора В.Б. Сбойчакова
и доктора медицинских наук В.В. Малышева*

Сборник материалов

СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2017. – 327 с.

Подготовлено на основе материалов, присланных авторами.

Редакция не несет ответственности за содержание опубликованной информации.

ВСЕРОССИЙСКАЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

**ИННОВАЦИИ В МЕДИЦИНСКОЙ,
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ,
ВЕТЕРИНАРНОЙ И ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ**

ТЕЗИСЫ



цинских организациях России (ПУ № ФСР 2008/03081 от 30 июля 2008) для обогащения плотных питательных сред и определения гемолитической активности культивируемых микроорганизмов. Кровь баранья дефибринированная для питательных сред стерильная (комплектации №1) имеет срок годности 14 суток, а при добавлении цитрата натрия (комплектация №2) срок годности увеличивается до 30 суток.

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ MORAXELLA CATARRHALIS И PSEUDOMONAS AERUGINOSA ПРИ ОСЛОЖНЕННЫХ ФОРМАХ ЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Мирсаяпова И.А., Хакимова Л.Р., Адиятуллин И.И.,
Файзуллина А.Р., Иванова С.С.

*Башкирский государственный медицинский университет,
г. Уфа*

Инфекционная патология органов дыхательной системы человека остается одной из наиболее актуальных проблем, поскольку занимает четвертое место среди причин летальных исходов, приводит к инвалидности и лидирует по числу дней нетрудоспособности у заболевших [1]. Спектр этиологически значимых бактериальных патогенов при инфекционных поражениях воздухоносных путей чрезвычайно широк, в частности при внебольничных пневмониях в мокроте обнаруживают *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, реже – *M. catarrhalis* и *P. aeruginosa* [2]. Однако негативный вклад указанных микроорганизмов в развитие осложнений в виде хронического бронхита, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) или бронхиальной астмы (БА) не ясен, поскольку их выявляемость на фоне лечения существенно снижается и может не определяться методом детекции возбудителя [3].

Цель работы. Оценка частоты встречаемости *M. catarrhalis* и *P. aeruginosa* при осложненных формах патологии органов дыхательной системы и использовании полимеразной цепной реакции, не предполагающей выделения чистой культуры возбудителя.

Для выделения ДНК использованы стандартные наборы, амплификация проводилась с применением подобранных нами праймеров и режимов, с электрофоретической детекцией результатов [3].



В результате было исследовано 190 образцов мокроты пациентов пульмонологических отделений. У 114 (60%) пациентов при осложненных формах дыхательной патологии обнаружена ДНК *M. catarrhalis*, из них: в 33,3% случаев при затяжной внебольничной пневмонии, в 22%, 22,8% и 21,9% случаев при бронхите, ХОБЛ и БА соответственно. В 70 образцах мокроты была обнаружена ДНК *P. aeruginosa*, из них: в 30% случаев при затяжной внебольничной пневмонии, в 35,8%, 17,1% и 17,1% случаев при бронхите, ХОБЛ и БА соответственно.

Таким образом, *M. catarrhalis* обнаруживались достоверно чаще при затяжной внебольничной пневмонии, ХОБЛ и БА. Однако у пациентов, у которых обнаруживалась ДНК *P. aeruginosa*, заболевание характеризовалось более тяжелым клиническим течением.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Москалев А.В., Косильникова А.С.

*Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова,
Санкт-Петербург*

Современное течение туберкулезной инфекции отличается выраженной супрессией активности иммунной системы. Это отражается на механизмах фагоцитоза, на активности эффекторных иммунокомпетентных клеток. Однако целостного представления об изменениях клеточных, гуморальных факторов иммунной системы не приводится. Поэтому целью нашей работы было отразить основные изменения иммунной системы при туберкулезе.

Так во многих работах отражается способность *M. tuberculosis* ингибировать процесс слияния лизосомы и фагосомы макрофага после ее захвата, что препятствует развитию специфического иммунного ответа. В результате этого у больного развивается хроническое системное воспаление. Установлено, что при нарушении слияния фагосомы и лизосомы внутри макрофага, вызванного инфицированием *M. tuberculosis*, происходит изменение фагоцитарных реакций: «процессинг» и представление антигена другим клеткам иммунной системы не осуществляется, «классический» иммунный ответ на внедрение микобактерии не развивается. Это позволяет патогену долгое время находиться в «тени» и размножаться, используя макрофаг в качестве экологического депо. Кроме того, количество тканевых макрофагов, способных к фагоцитозу снижено от 18,5% до 24,7%. Важным нарушением метаболизма макрофагов является снижение синтеза супероксиданиона в ответ на стимуляцию в 35,6% случаев.



СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭЛЮАТОВ ВОДЫ НА МАРКЕРЫ ВИРУСНОЙ КОНТАМИНАЦИИ Малышев В.В., Змеева Т.А., Перелыгин В.В., Клецко Л.И., Прошина Л.А., Бокарев М.А.	191
ИННОВАЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОМУ КОНТРОЛЮ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ И ГАРМОНИЗАЦИЯ ЕГО С МЕЖДУНАРОДНЫМИ ТРЕБОВАНИЯМИ Малышев В.В., Змеева Т.А., Бокарев М.А., Пеньковская Н.А.	192
ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА, КЛИНИКО- ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ В КРЫМУ Малышев В.В., Читакова А.Э., Пеньковская Н.А.	195
РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ОСНОВНЫМ ВОЗБУДИТЕЛЯМ TORCH-ИНФЕКЦИЙ В ФОРМАТЕ ЛИНЕЙНОГО ИММУНОБЛОТТИНГА Марданлы С.Г., Арсеньева В.А., Амелина Е.А., Марданлы С.С.	196
ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ВЫПУСКА ДЕФИБРИНИРОВАННОЙ КРОВИ БАРАНА ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД Марданлы С.С., Бахилина Н.В., Котляр М.А., Ротанов С.В.	198
ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ MORAXELLA CATARRHALIS И PSEUDOMONAS AERUGINOSA ПРИ ОСЛОЖНЕННЫХ ФОРМАХ ЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА Мирсаяпова И.А., Хакимова Л.Р., Адиятуллин И.И., Файзуллина А.Р., Иванова С.С.	199
ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ Москалев А.В., Косульникова А.С.	200



Вестник Башкирского государственного медицинского университета

сетевое издание

ISSN 2309-7183



приложение №1, 2017

vestnikbgmu.ru



Сборник материалов
82-й Всероссийской научной конференции
студентов и молодых ученых
«Вопросы теоретической и практической
медицины»

Часть 1

БИОЛОГИЯ, МИКРОБИОЛОГИЯ, ФИЗИКА

- 4 | Вестник Башкирского государственного медицинского университета
Приложение №1, 2017 г

<u>АДГЕЗИВНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОКУЛЬТУР И СОКУЛЬТИВИРОВАННЫХ БАКТЕРИЙ PORPHYROMONAS GINGIVALIS И AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETES COMITANS</u>	81
<u>П. Д. ГОРБАТОВ, Л. А. НУРЕТДИНОВА</u> <u>ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ВЗЯТИЯ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ В ГИНЕКОЛОГИИ</u>	81
<u>Г.Ф. КАДЫРБАЕВ, И.И. ДАВЛЕТКУЖИНА, Р.А. ГАРИФУЛЛИН</u> <u>ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ЗУБНОГО НАЛЕТА</u>	91
<u>Л.З. БУЛЯКБАЕВА, Д.Р. МУРТАЗИНА, К.И. МУХАМЕТЬЯНОВА</u> <u>РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ РЕПАРАЦИИ ДНК: XRCC1, XPA, XPD В РАЗВИТИИ РЕЦИДИВА МЫШЕЧНО-НЕИНВАЗИОННОГО РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ</u> ...	93
<u>Д.Э. ЭМИРОВА, Т.И. РАМАЗАНОВ</u> <u>ОЦЕНКА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ КЛЕТОК БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГОРОДСКИХ И СЕЛЬСКИХ ЖИТЕЛЕЙ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН</u>	103
<u>Л.Р. ХАКИМОВА, С.Ф. АФЛЯТУНОВА, С.С. ИВАНОВА, Э.В. УРАЗБАХТИНА, И.А. МИРСАЯПОВА</u> <u>МОЛЕКУЛЯРНАЯ-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ ВЕРХНИХ И НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ</u>	104
<u>Л.Р. ХАКИМОВА, Л.О. БИЖБАЛОВА, Л.Р. ШАМСУТДИНОВА</u> <u>ХАРАКТЕРИСТИКА ВИДОВОГО СОСТАВА МИКРОБИОТЫ ПРИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЯХ И ОЦЕНКА ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ</u>	114
<u>К.Ю. ШВЕЦ, Э.Р. ТАМАРОВА, Г.М. РЫСКУЛОВА</u> <u>ПРОВЕДЕНИЕ КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ И ПАРОДОНТОЛОГИЧЕСКИХ ИНДЕКСОВ</u>	119

УДК 616.24-002-078:577.21.08

Л.Р. Хакимова, С.Ф. Афлятунова, С.С. Иванова, Э.В. Уразбахтина, И.А. Мирсаяпова
МОЛЕКУЛЯРНАЯ-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ
СТРУКТУРЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ ВЕРХНИХ И НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Научный руководитель — д. м. н., профессор А.Р. Мавзютов

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии, Башкирский
государственный медицинский университет, г. Уфа

Резюме. В мокроте пациентов с патологией дыхательных путей: бронхит, пневмония, ХОБЛ и бронхиальная астма, методом ПЦР в 49 случаях (39,8%) выявлены *Mycobacterium* spp., в 41 случае (33,3%) - видоспецифичные фрагменты ДНК *Pseudomonas aeruginosa*, ДНК *Haemophilus influenzae* - у 31 (25,2%) и *Moraxella catarrhalis* также - у 31 (25,2%) пациента. В 23,4% случаев обнаруживались два и более видов пневмопатогенов одновременно. При этом культуральным методом этиологию заболеваний дыхательной системы у находившихся под наблюдением пациентов удалось расшифровать лишь в 15 случаях (12%), когда были выделены *P.aeruginosa*.

Ключевые слова: микробиота, пневмонии, ХОБЛ, бронхиты, ПЦР.

L.R. KHakimova, S.S. Ivanova, S.F. Aflyatunova, E.V. Urazbakhtina, I.A. Mirsayapova
MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF THE ETHIOLOGICAL
STRUCTURE OF DISEASES OF UPPER AND LOWER RESPIRATORY WAYS

Scientific Advisor — Ph. D. in Medicine, Full professor A.R.Mavzyutov

Department of Fundamental and Applied Microbiology, Bashkir State Medical University,
Ufa

Abstract. In the sputum of patients with respiratory pathology: bronchitis, pneumonia, COPD and bronchial asthma, 49 cases (39.8%) were detected by *Mycobacterium* spp., in 41 cases (33.3%) - species-specific fragments of *P. aeruginosa* DNA, DNA of *H. influenzae* - in 31 (25.2%) and *M.catarrhalis* also in 31 (25.2%) patients. In 23,4% of cases, two or more types of pneumopathogens were detected. In this case, with the culture method the etiology of diseases of the respiratory system in the patients under observation was only deciphered in 15 cases (12%), when *P. aeruginosa* cultures were isolated.

Keywords: microbiota, pneumonia, COPD, bronchitis, PCR.

Актуальность. Достаточно долго нижние отделы дыхательного тракта, в частности легкие, считались стерильными, что в основном было связано с преимущественным применением культуральных методов исследования [6]. Однако в последние годы были получены

убедительные доказательства того, что легкие не являются стерильными, степень их микробной обсемененности и видовой состав микроорганизмов определяется тремя основными факторами: поступлением бактерий с вдыхаемым воздухом, микробная обсемененность которого достигает значений 10^4 - 10^6 бактерий/мм³, выведением микроорганизмов с выдыхаемым воздухом и скоростью их колонизации и размножения непосредственно на слизистых дыхательных путей и в легких [7]. В норме все эти процессы сбалансированы [5]. Однако при патологических состояниях микробиота дыхательных путей и легких претерпевает существенные количественные и качественные изменения [3,4,6], увеличивается количество представителей рода *Bacteroidetes*, значительно возрастает количество грамотрицательных бактерий. С ними в дальнейшем связывают бронхоэктазы [11], смертность на фоне идиопатического фиброза легких [10] и индуцированную кортикостероидами и антибиотиками астму [8,9], тяжелые случаи внебольничной пневмонии [1]. Однако в большинстве случаев этиология поражений легких и дыхательных путей остается нерасшифрованной, что в большинстве случаев связано с недостаточной информативностью методов исследования клинического материала [2].

Цель исследования. Молекулярно-генетическая характеристика видового состава микроорганизмов, обнаруживаемых при заболеваниях верхних и нижних дыхательных путей.

Материалы и методы. Объектами исследования в данной работе являлись 123 пациента в возрасте $54,97 \pm 2,88$ лет, находившихся на стационарном лечении в пульмонологических отделениях больниц г.Уфы с различной патологией органов дыхания, а именно: внебольничная пневмония, бронхиальная астма, бронхит, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) различной степени тяжести. Материалом для исследования служила утренняя мокрота, из которой выделяли тотальную ДНК с помощью набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» («Интерлабсервис», Россия). Для проведения амплификации ДНК использовались, подобранные нами праймеры к родо- и видоспецифическим консервативным последовательностям генов 16S рРНК *Mycobacterium spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* из международного банка нуклеотидных последовательностей EMBL/GenBank. Амплификация ДНК производилась с использованием горячего старта на амплификаторе Терцик MC2 («ДНК-Технология», Россия). Детекцию ПЦР-продуктов осуществляли методом агарозного гель-электрофореза. Все исследованные образцы мокроты параллельно исследовались культуральным методом в соответствии с принципами клинической микробиологии. Статистический анализ проводился с использованием программ Microsoft Excel 2010 и AtteStat.

Результаты и обсуждения. В результате проведенных исследования ДНК *Mycobacterium spp.* была выявлена в 49 случаях (39,8%), видоспецифичные фрагменты ДНК *P.aeruginosa* - в 41 случае (33,3%), ДНК *H.influenzae* - у 31 (25,2%) и *M. catarrhalis* также - у 31 (25,2%) пациента (рис.1).

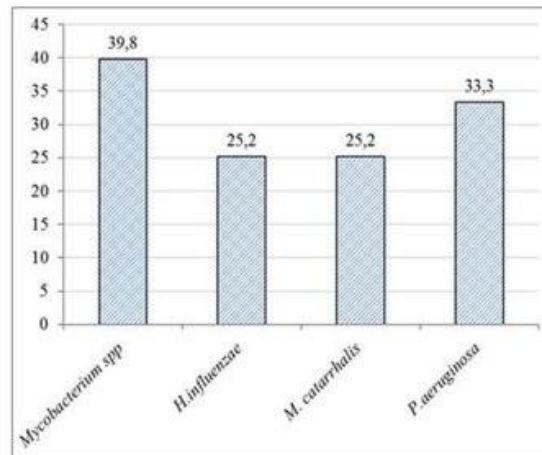


Рис.1. Частота встречаемости (в %) труднокультивируемых бактерий в мокроте пациентов при патологии дыхательных путей.

Необходимо отметить, что в 23,4% случаев обнаруживалась смешанная микробиота, представленная двумя и более видами микроорганизмов одновременно (рис.2).

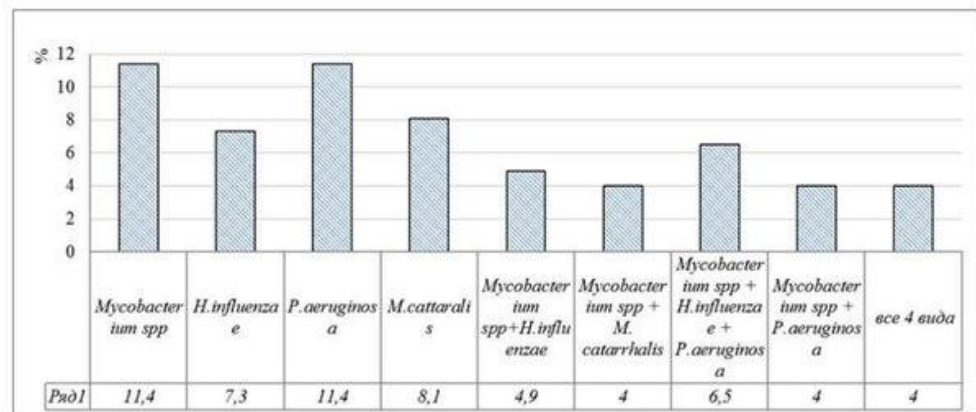


Рис.2. Видовой состав пневмопатогенов, выявленных методом ПЦР в мокроте пациентов с патологией дыхательной системы.

112 | Вестник Башкирского государственного медицинского университета
Приложение №1, 2017 г

В 4% случаев одновременно обнаруживались все 4 вида пневмопатогенов, в 6 % - 3 вида, в 12,9% случаев обнаруживались по 2 вида бактерий, при этом во всех ассоциациях присутствовали *Mycobacterium spp.*

Заключение и выводы. В результате бактериологического исследования этиологию заболеваний дыхательной системы у находившихся под наблюдением пациентов удалось расшифровать лишь в 15 случаях (12%), когда были выделены культуры *P.aeruginosa*, тогда как *Mycobacterium spp.*, *M.catarrhalis* и *H.influenzae* не были выявлены ни в одном из случаев. Таким образом, труднокультивируемые пневмопатогены (*Mycobacterium spp.*, *M.catarrhalis*, *H.influenzae*) при патологии дыхательной системы не менее актуальны, нежели *P.aeruginosa*, но для обнаружения необходимо использование метода ПЦР.

Список литературы.

1. Караулов А.В., Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Хайрулин Р.М., Мавзютов А.Р. Клинико-иммунологические особенности внебольничной пневмонии. Иммунокоррекция. – Уфа: «Мир печати», 2010. – 184 с.
2. Мавзютов А.Р., Мирсаяпова И.А., Хасанова Г.Ф., Баймиев А.Х. СРАВНИТЕЛЬНАЯ Оценка информативности методов этиологической диагностики внебольничной пневмонии // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 12. – С. 35-38.
3. Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Мавзютов А.Р., Кузовкина О.З., Хасанова Г.Ф. Клинические и микробиологические особенности внебольничной пневмонии // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2010. – № 2. – С. 96-101.
4. Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Huffnagle G.B. The role of the bacterial microbiome in lung disease // *Expert Rev Respir Med.* – 2013. – V. 7. – P. 245–257.
5. Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Huffnagle G.B. Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogenesis // *Lancet Respir Med.* – 2014. – V. 2. 238–246.
6. Dickson R.P., Huffnagle GB The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease // *PLoS Pathog.* – 2015. – V. 11(7). e1004923. doi:10.1371/journal.ppat.1004923.
7. Dickson R.P., Martinez F.J., Huffnagle G.B. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases // *Lancet.* – 2014. – V. 384. – P. 691–702.
8. Goleva E., Jackson L.P., Harris J.K., Robertson C.E., Sutherland E.R., Hall C.F. et al. The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2013. – V. 188. – P. 1193– 1201.
9. Huang Y.J., Nelson C.E., Brodie E.L., Desantis T.Z., Baek M.S., Liu J. et al. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma // *J Allergy Clin Immunol.* – 2011. – V. 127. – P. 372–381.
10. Molyneaux P.L., Cox M.J., Willis-Owen S.A., Mallia P., Russell K.E., Russell A.M. et al. The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2014. – V. 190. – P. 906–913.
11. Rogers G.B., Zain N.M., Bruce K.D., Burr L.D., Chen A.C., Rivett D.W. et al. A novel microbiota stratification system predicts future exacerbations in bronchiectasis // *Ann Am Thorac Soc.* – 2014. – V. 11. – P. 496–503.

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Башкирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

1

ИВАНОВА СВЕТЛАНА СЕРГЕЕВНА

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Руководитель:
Научный консультант

д. м. н. Мавзютов А.Р.
к. б. н. Хакимова Л.Р.

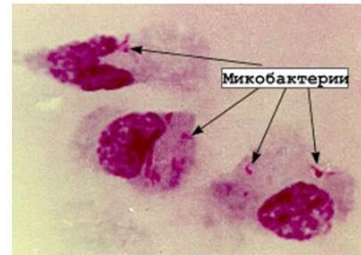
АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

2



ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

- Диагностика микобактериоза остается сложной проблемой, так как большая часть нетуберкулезных микобактерий является условно-патогенной и до настоящего времени не разработаны методы постановки диагноза и подходы к лечению этого заболевания .



Цель работы –Совершенствование методологии ПЦР-детекции нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале и экспериментальная оценка частоты их встречаемости при ХОБЛ.

Задачи:

1. Сбор клинического материала (мокроты) у пациентов с патологиями дыхательных путей.
2. Выделение ДНК с помощью набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ».
3. Амплификация ДНК с родоспецифичными праймерами.
4. Анализ частоты встречаемости микобактерий при ХОБЛ и сравнение с другими диагнозами.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

- 169 человек с различными патологиями дыхательных путей;
- Бактерии рода *Mycobacterium spp.*

МЕТОДЫ

- Выделение ДНК микобактерий с помощью «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ»;
- ПЦР-анализ;
- Детекция ПЦР-продуктов методом агарозного геле-электрофореза;
- Статистический анализ данных



ДЕТЕКЦИЯ *MYCOBACTERIUM SPP.* В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ МЕТОДОМ ПЦР

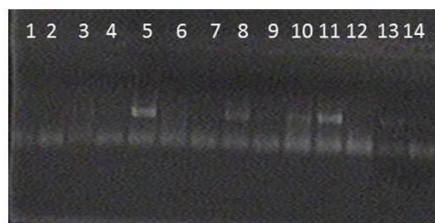


Рисунок 1 – Электрофореграмма результатов амплификации ДНК исследуемых образцов мокроты; 1 – ДНК - отрицательный контрольный образец; 2- 14 - ДНК исследуемых образцов.



1

Частота встречаемости пациентов с диагнозом ХОБЛ и соотношение возраста и проявления симптомов заболевания дыхательных путей

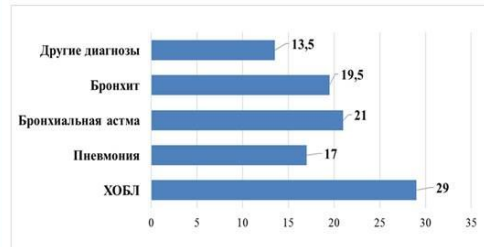


Рисунок 2 – Выборка пациентов с различными патологиями дыхательных путей (в процентах)

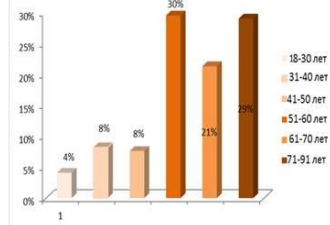
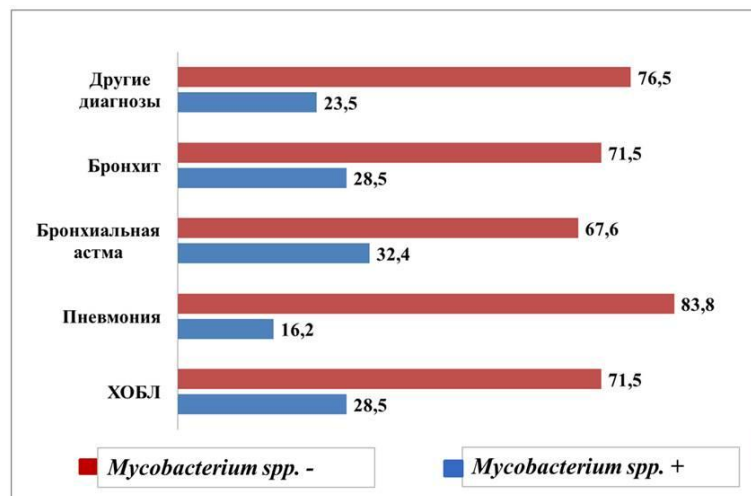


Рисунок 3 – Соотношение возраста и проявления симптомов заболевания дыхательных путей

8

Частота встречаемости *Mycobacterium spp.*



ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АНАЛИЗА КРОВИ

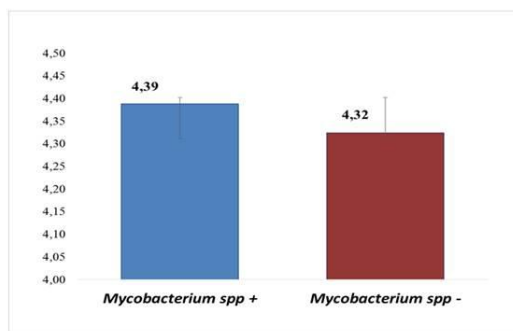


Рисунок 4 – Показатели эритроцитов у пациентов с положительным и отрицательным результатом на микобактерии (10*12/л)

ВЫВОДЫ

1. В ходе работы был отобран клинический материал от 169 больных с различными патологиями дыхательных путей, в том числе с диагнозом хроническая обструктивная болезнь легких.
2. Среди заболеваний дыхательных путей диагноз ХОБЛ встречается чаще.
3. Выделена ДНК с клинического материала набором «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ».
4. Проведен ПЦР-анализ с родоспецифичными праймерами.
5. Исследование мокроты на ДНК бактерий рода *Mycobacterium spp.* выявило наличие микобактериоза у 29% пациентов с различными патологиями дыхательных путей и у 28,6% с диагнозом ХОБЛ.

ТЕЗИСЫ И СТАТЬИ В СБОРНИКАХ КОНФЕРЕНЦИЙ

1. Мирсаяпова И.А., Хакимова Л.Р., Адиятуллин И.И., Файзуллина А.Р., Иванова С.С. Частота встречаемости *Moraxella catarrhalis* и *Pseudomonas aeruginosa* при осложненных формах легочной патологии человека // Материалы всероссийской научно-практической конференции «Инновации в медицинской, фармацевтической, ветеринарной и экологической микробиологии». Санкт-Петербург. – 2017. – С.199-200.
2. Хакимова Л.Р., Афлятунова С.Ф., Иванова С.С., Уразбахтина Э.В., Мирсаяпова И.А. Молекулярно-генетическая характеристика этиологической структуры заболеваний верхних и нижних дыхательных путей // Материалы 82-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины». Уфа. – 2017. – С.109-113.

Частота встречаемости нетуберкулезных микобактерий при хронической обструктивной болезни легких

Слайд 2

По данным ВОЗ на сегодняшний день ХОБЛ занимает 4 место по смертности в мире в возрастной группе старше 45 лет, при этом смертность неуклонно растет. Значительный рост повсеместного ущерба от ХОБЛ отражается в увеличении курения, профессиональных факторах, наследственной предрасположенности, а также изменение возрастной структуры населения. На первых этапах ХОБЛ протекает без клинических проявлений, больные жалоб не имеют. Доказано, что наиболее частыми причинами обострений ХОБЛ являются бактериальные и вирусные респираторные инфекции и загрязняющие вещества в атмосферном воздухе, однако причиной примерно 20-30% случаев обострений установить не удастся. Считается, что большинство пациентов заражаются нетуберкулезными микобактериями из окружающей среды, но механизм их поступления в организм точно не известен. Среди бактерий при обострении ХОБЛ обнаруживаются нетипируемые *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Moraxella catarrhalis*, энтеробактерии и *Pseudomonas aeruginosa*. Но в последнее время исследование нетуберкулезных микобактерий показало их этиологическую значимость.

Слайд 3

Диагностика микобактериоза остается сложной проблемой, так как большая часть нетуберкулезных микобактерий является условно-патогенной и до настоящего времени не разработаны методы постановки диагноза и подходы к лечению этого заболевания.

Слайд 4

Поэтому целью моей работы являлась совершенствование методологии ПЦР-детекции нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале и экспериментальная оценка частоты их встречаемости при ХОБЛ.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Сбор клинического материала (мокроты) у пациентов с патологиями дыхательных путей.
2. Выделение ДНК с помощью набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ».
3. Амплификация ДНК с родоспецифичными праймерами.
4. Анализ частоты встречаемости микобактерий при ХОБЛ и сравнение с другими диагнозами.

Слайд 5

Объектами исследования были образцы мокроты, выделенные от 169 человек в возрасте от 18 до 91 лет; Бактерии рода *Mycobacterium spp.*

Методы данного исследования:

Выделение ДНК микобактерий с помощью «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ»;

ПЦР-анализ;

Детекция ПЦР-продуктов методом агарозного гель-электрофореза.

Статистический анализ данных.

Слайд 6

Среди исследуемых пациентов диагноз ХОБЛ был у 29%. По сравнению с другими заболеваниями дыхательных путей диагноз ХОБЛ встречается чаще.

В выборке пациентов были 86 мужчин и 83 женщины, то есть примерно одинаковое количество.

Кроме того, все пациенты относились к различным возрастным группам. По диаграмме видно, что проявления симптомов заболевания чаще происходит у людей пожилого возраста: 18-30 лет – 4,1%, 31-40 – 8,2%, 41-50 – 7,6%, 51-60 – 29,5%, 61-70 – 21,5%, 71-91 – 29%. При этом заболевание чаще всего характеризовалось тяжелым клиническим течением.

Слайд 7

При исследовании мокроты для обнаружения *Mycobacterium spp.* Были использованы родоспецифичные праймеры. При оценке результатов амплификации ПЦР с ранее подобранными праймерами положительными считались пробы (то есть содержащими ДНК микроорганизма), в которых размер продукта, выявленный в геле, соответствовал ожидаемому размеру продукта. А у отрицательного контрольного образца после проведения ПЦР продукт амплификации не определялся.

Слайд 8

Было выявлено, что у пациентов диагнозом ХОБЛ *Mycobacterium spp.* встречаются довольно часто, по сравнению с другими заболеваниями дыхательных путей, что представлено на диаграмме. Частота встречаемости *Mycobacterium spp.* при ХОБЛ составляет 28,5%, при пневмонии 16,2%, при бронхиальной астме 32,4%, при бронхите 28,5%, при других диагнозах – 23,5%.

Слайд 9

В ходе исследования были проверены показатели крови: эритроциты, гемоглобин, лейкоциты и получены следующие данные. Большинство больных (98 из 169 чел. — 58%) имеют нормальный уровень эритроцитов, у 49 человек (29%) уровень эритроцитов ниже нормы, а у 9 человек (14,2%) — выше нормы. После детекции *Mycobacterium spp.* в клиническом материале при помощи ПЦР-анализа были сравнены показатели эритроцитов у

пациентов с положительным результатом. Статистически значимой разницы значений между показателями пациентов с микобактериозом и без него не было.

Слайд 10

Кроме того, были сравнены показатели лейкоцитов и гемоглобина. Также статистически значимой разницы значений между показателями не было.

Большинство больных (89 чел. – 52,6%) имеют нормальный уровень гемоглобина, у 62 человека (36,6%) уровень гемоглобина ниже нормы, а у 18 человек (10,6%) – выше нормы.

Большинство больных (104 чел. – 61,5%) имеют нормальный уровень лейкоцитов, у 60 человек (35,5%) уровень лейкоцитов выше нормы, а у 5 человек (3%) – ниже нормы.

В результате сравнения основных показателей крови выяснилось, что статистически значимой разницы между значениями не было. Отсюда можно сделать вывод о том, что, анализируя общий анализ крови у пациентов с патологиями дыхательных путей, нельзя делать какие-либо различия между пациентами с микобактериозами и без.

Слайд 11 Выводы:

6. В ходе работы был отобран клинический материал от 169 больных с различными патологиями дыхательных путей, в том числе с диагнозом хроническая обструктивная болезнь легких.

7. Среди заболеваний дыхательных путей диагноз ХОБЛ встречается чаще.

8. Выделена ДНК с клинического материала набором «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ».

9. Проведен ПЦР-анализ с родоспецифичными праймерами.

10. Исследование мокроты на ДНК бактерий рода *Mycobacterium spp.* выявило наличие микобактериоза у 29% пациентов с различными патологиями дыхательных путей и у 28,6% с диагнозом ХОБЛ.

Таким образом, исследование ДНК, выделенной из образцов клинического материала (мокроты), показало, что ПЦР-анализ является высокоспецифичными и чувствительными, что является важным фактором при лабораторной диагностике, а подобранные родоспецифичные праймеры действительно обладают высокой специфичностью и могут применяться при исследовании клинического материала на наличие бактерий рода *Mycobacterium*.

Как было показано, при диагностике микобактериозов нельзя опираться на данные показателей крови, так как статистически значимой

разницы между значениями у пациентов с патологиями дыхательных путей нет. Кроме того, все эти показатели практически находились в пределах нормы.

Слайд 12

По теме работы опубликована 1 статья и один тезис в сборниках материалов конференций.

Доклад закончен, спасибо за внимание!

Выпускная квалификационная работа выполнена мной самостоятельно. Использованные в работе материалы из опубликованной научной литературы и других источников имеют ссылки на них. Проверка в системе «Антиплагиат» выполнена. Уровень оригинальности работы составляет 78.98%.

Работа изложена на 57 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы, 11 рисунков. Библиографический список включает 63 источника, из них 12 отечественных и 51 иностранных авторов.

ОТЗЫВ

научного руководителя на выпускную квалификационную (дипломную) работу студентки 4 курса по направлению подготовки 06.03.01. – «Биология» медико-профилактического факультета с отделением микробиологии **Ивановой Светланы Сергеевны** на тему «Частота встречаемости нетуберкулезных микобактерий при хронической обструктивной болезни легких».

Дипломная работа Ивановой Светланы Сергеевны посвящена изучению частоты встречаемости микобактерий при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Работа выполнена с использованием теоретических основ микробиологии. Анализ данных исследования проведен комплексно с применением необходимых практических навыков. Практическая часть работы выполнена самостоятельно. В работе исследованы предоставленные клинические образцы, а также методы: ПЦР-анализ, детекция ПЦР-продуктов методом агарозного гель-электрофореза.

За время выполнения выпускной квалификационной работы Иванова С.С. зарекомендовала себя как работоспособный студент, имеющий достаточную теоретическую подготовку и стремящийся к развитию.

Иванова С.С. является 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 **Ивановой Светланы Сергеевны** на тему «Частота встречаемости нетуберкулезных микобактерий при хронической обструктивной болезни легких».

Выпускная квалификационная работа выполнена на актуальную тему, поскольку диагностика микобактерий остается сложной проблемой и до настоящего времени не разработаны методы постановки диагноза и подходы к лечению этого заболевания.

Ивановой С.С. обработано большое количество научного материала, на высоком теоретическом и методологическом уровне проведено исследование проблем диагностики ХОБЛ. Материал в выпускной квалификационной работе логически структурирован, написан научным стилем изложения.

К положительным сторонам данной работы следует отнести комплексный анализ частоты встречаемости микобактерий при ХОБЛ, указания не только проблем диагностики нетуберкулезных микобактерий, но и проведение сравнительной характеристики информативности тест-системы для обнаружения нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале.

Сформулированные в работе выводы достаточно обоснованы и могут быть использованы в практической деятельности. Существенных недостатков в выпускной квалификационной работе не выявлено.

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 **Ивановой Светланы Сергеевны** на тему «Частота встречаемости нетуберкулезных микобактерий при хронической обструктивной болезни легких».

Выпускная квалификационная работа выполнена на актуальную тему, поскольку микобактериозы легких получили в последние годы известность в связи с улучшением лабораторных методов выделения и идентификации нетуберкулезных микобактерий. Диагностика микобактериоза остается сложной проблемой, так как большая часть нетуберкулезных микобактерий является условно-патогенной и до настоящего времени не разработаны методы постановки диагноза и подходы к лечению этого заболевания

Ивановой С.С. обработано большое количество научного материала, на высоком теоретическом и методологическом уровне проведено исследование проблем диагностики ХОБЛ. Материал в выпускной квалификационной работе логически структурирован, написан научным стилем изложения.

К положительным сторонам данной работы следует отнести комплексный анализ частоты встречаемости микобактерий при ХОБЛ, указания не только проблем диагностики нетуберкулезных микобактерий, но и проведение сравнительной характеристики информативности тест-системы для обнаружения нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале.

Ивановой С.С. опубликовано 2 научные работы, что является хорошим показателем для студента-бакалавра.

Проведенное Ивановой С.С. исследование свидетельствует о том, что автор в достаточной мере владеет методами научного анализа и обладает достаточно высоким уровнем подготовленности к проведению научных работ.

Рецензент:

Научный сотрудник

ФГБУН Института биохимии и генетики

Уфимского научного центра РАН,

кандидат биологических наук

ДЛЯ
ДОКУМЕНТОВ

Благова Д.К.

автор

Института биохимии и генетики

Уфимского научного центра Российской академии наук

Ф.Р. Гималов

Д.К. Благова

20.06.2017

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 выгрузки: 23.06.2017 09:45:08

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

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

Организация: Башкирский государственный медицинский университет

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

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 1883

Имя исходного файла: ИВАНОВА С.С.

Размер текста: 90 кБ

Символов в тексте: 65174

Слов в тексте: 7815

Число предложений: 1036

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Отчет от 23.06.2017 09:45:11 - Последний готовый отчет (ред.)

Комментарии: не указано

Модули поиска:

ЗАИМСТВОВАНИЯ

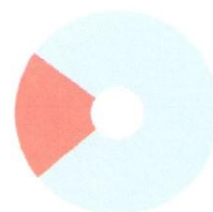
21.02%

ЦИТИРОВАНИЯ

0%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

78.98%



№	Заимств.	Источник	Ссылка	Загрузка	Модуль поиска
[01]	4.04%	Полный текст диссертации	http://ssmu.ru	11 Дек 2016	Модуль поиска Интернет
[02]	3.65%	Навигация (8/10)	http://amede.org	08 Янв 2016	Модуль поиска Интернет
[03]	1.8%	Полный текст диссертации (3/11)	http://ssmu.ru	07 Окт 2016	Модуль поиска Интернет
[04]	1.68%	file downloaded from PubMed here	http://cbs.dtu.dk	22 Apr 2017	Модуль поиска Интернет
[05]	1.51%	http://www.volgmed.ru/uploads/files/2014-11/34231-federalnye_klinicheskie_rek...	http://volgmed.ru	20 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет
[06]	1.42%	Горина Арина курсовая Арина 4 курс _2_редактированная.docx	не указано	05 Мая 2017	Кольцо вузов
[07]	1.35%	ref_Nemchenko.rar (3/6)	http://nzmmedek.ru	30 Янв 2015	Модуль поиска Интернет
[08]	1.34%	Дженжера, Григорий Евгеньевич диссертация ... кандидата медицинских наук...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[09]	1.34%	Гилязов, Ильдар Раисович диссертация ... кандидата медицинских наук: 14.0...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[10]	1.3%	237243	http://bibliodub.ru	19 Apr 2016	Модуль поиска ЗЭС "Университетская библиотека онлайн"
[11]	1.28%	138556	http://bibliodub.ru	раньше 2011	Модуль поиска ЗЭС "Университетская библиотека онлайн"
[12]	1.22%	Похилок Анастасия Геннадьевна Похилок 04.05.2017.doc	не указано	05 Мая 2017	Кольцо вузов
[13]	1.13%	Гемофильная палочка	http://ru.wikipedia.org	раньше 2011	Модуль поиска Интернет
[14]	1.11%	Скачать диссертацию	http://gabrich.ru	21 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет
[15]	1.1%	259161	http://bibliodub.ru	19 Apr 2016	Модуль поиска ЗЭС "Университетская библиотека онлайн"
[16]	1.03%	Мельник Полина Сергеевна ____Курсовая Мельник П. 2017 _03.05.17_ Ч6.d...	не указано	05 Мая 2017	Кольцо вузов
[17]	1.02%	Киселев, Андрей Валерьевич диссертация ... кандидата медицинских наук: 14...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[18]	0.97%	208988	http://bibliodub.ru	раньше 2011	Модуль поиска ЗЭС "Университетская библиотека онлайн"
[19]	0.94%	Загрузка книги в формате PDF (10/10)	http://atm-press.ru	25 Дек 2014	Модуль поиска Интернет
[20]	0.94%	(SAB)', Nutricia Netherlands, Pfizer, and Partners in Care Solutions (PICASSO) for C...	http://repub.eur.nl	23 Apr 2017	Модуль поиска Интернет
[21]	0.9%	не указано	http://do.rulitru.ru	02 Мая 2014	Модуль поиска Интернет
[22]	0.88%	Коротких участков днк, специфичных для конкретных микроорганизмов	http://kk.convdocs.org	раньше 2011	Модуль поиска Интернет
[23]	0.85%	Омельченко, Андрей Владимирович диссертация ... кандидата биологически...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[24]	0.82%	Лекция по ХОБЛ	http://studfiles.ru	24 Июля 2016	Модуль поиска Интернет

[25]	0.79%	Гейно Ксения Евгеньевна Diplom_Geyno исправленный.doc	не указано	04 Июн 2017	Кольцо вузов
[26]	0.79%	Горбачевич Ангелина Александровна ДИПЛОМ____.docx	не указано	18 Мая 2017	Кольцо вузов
[27]	0.79%	ДИПЛОМ____	не указано	23 Мая 2017	Кольцо вузов
[28]	0.79%	ДИПЛОМ____	не указано	22 Мая 2017	Кольцо вузов
[29]	0.79%	ДИПЛОМ____	не указано	24 Мая 2017	Кольцо вузов
[30]	0.77%	Лекция № 10 Сучасні методи ДНК аналізу. Kursak.NET	http://kursak.net	11 Янв 2016	Модуль поиска Интернет
[31]	0.73%	Дементьева, Елена Александровна Москва 2005	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[32]	0.73%	2016BKP088134BOБЛИКОВ.docx	не указано	04 Июн 2016	Кольцо вузов
[33]	0.72%	227856	http://bibliodub.ru	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"
[34]	0.72%	Михалева, Ольга Олеговна диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.0.	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[35]	0.7%	Вестник новых медицинских технологий. Том XVIII, № 2, 2011	http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"
[36]	0.69%	Майорова, Ангелина Александровна диссертация ... кандидата биологически...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[37]	0.68%	Читать книгу Болезни органов дыхания. Учебное пособие Инны Викторовой.	http://knigi.net	11 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет
[38]	0.65%	Неверовская Анастасия Валерьевна ЛИТЕРАТУРА.docx	не указано	22 Мая 2017	Кольцо вузов
[39]	0.64%	253922	http://bibliodub.ru	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"
[40]	0.64%	59860	http://e.lanbook.com	раньше 2011	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[41]	0.63%	Крижановская Екатерина Олеговна диплом Валериана.doc	не указано	21 Мая 2017	Кольцо вузов
[42]	0.63%	диплом Валериана	не указано	23 Мая 2017	Кольцо вузов
[43]	0.61%	Iskhuzhina_I_doc_1_Vosstanovlen.doc	не указано	23 Дек 2015	Кольцо вузов
[44]	0.61%	diplom_Iskhuzhinoy_Larisy_1.doc	не указано	23 Дек 2015	Кольцо вузов
[45]	0.58%	Зао «издательство бином» 2000 481 - Книга	http://textarchive.ru	06 Апр 2017	Модуль поиска Интернет
[46]	0.56%	Макарова, Марина Витальевна диссертация ... доктора биологических наук ...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[47]	0.52%	Соловьева, Ольга Георгиевна диссертация ... доктора медицинских наук : 14...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[48]	0.48%	Выпуск 7	http://kgau.ru	10 Янв 2017	Модуль поиска Интернет
[49]	0.45%	NYmnik_9104. Басангова Рада Владимировна. Совершенствование методов д...	http://umnik.fasie.ru	11 Мая 2017	Кольцо вузов
[50]	0.45%	131429	http://bibliodub.ru	15 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"
[51]	0.43%	Насыр Вероника Насыр В. 4 курс 05.05.2017.docx	не указано	05 Мая 2017	Кольцо вузов
[52]	0.43%	105138	http://bibliodub.ru	13 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"
[53]	0.43%	60055	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[54]	0.42%	Полный текст диссертации (2/11)	http://ssmu.ru	07 Окт 2016	Модуль поиска Интернет
[55]	0.41%	Гизатов, Альберт Якупович диссертация ... кандидата технических наук : 05.1...	http://dlib.rsl.ru	20 Янв 2010	Коллекция диссертаций РГБ
[56]	0.41%	4679	http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Модуль поиска ЭБС "Лань"
[57]	0.39%	Минина Юлия Сергеевна Курсовая_Минина.docx	не указано	06 Мая 2017	Кольцо вузов
[58]	0.38%	Колосов, Артем Викторович диссертация ... кандидата медицинских наук : 14...	http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Коллекция диссертаций РГБ
[59]	0.38%	Молекулярная генетика спорта	http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"
[60]	0.38%	210351	http://bibliodub.ru	18 Апр 2016	Модуль поиска ЭБС "Университетская библиотека онлайн"
[61]	0.37%	Семенов Денис Дмитриевич Курсовой проект Денис.docx	не указано	01 Мая 2017	Кольцо вузов
[62]	0.36%	ДиссерЛ	не указано	08 Фев 2013	Модуль поиска "БГМУ"
[63]	0.35%	Вестник новых медицинских технологий. Том XIX, № 2, 2012	http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Модуль поиска ЭБС "БиблиоРоссика"