

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

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

На правах рукописи



Гайнуллина Эльвина Дамировна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ
РОДОСПЕЦИФИЧНЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК *SAMPYLOBACTER*
SPP. В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ
КИШЕЧНИКА**

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор



А.Р. Мавзютов

Уфа – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	3
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Микробиота кишечника	7
1.2. Нарушение микробиоценоза при ВЗК	9
1.3. Воспалительные заболевания кишечника	11
1.4. Общие представления о бактериях рода <i>Campylobacter</i>	13
1.5. Эпидемиология	16
1.6. Маркеры кишечного воспаления при заболеваниях кишечника	17
1.7. Диагностика кампилобактерий	19
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
2.1. Клиническое и лабораторное обследование больных	23
2.2. Депарафинизация и выделение ДНК из биоптатов	23
2.3. Выделение ДНК из биоптатов набором «ДНК-сорб-С»	25
2.4. Выделение ДНК из кала	27
2.5. Праймеры, использованные в исследовании	29
2.6. Амплификация участков ДНК методом полимеразной цепной реакции	31
2.7. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле	36
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	38
3.1. Выделение ДНК	38
3.2. Праймеры для амплификации бактерий рода <i>Campylobacter</i>	39
3.3. ПЦР-анализ с ДНК, выделенной из биоптатов	40
3.4. ПЦР-анализ с ДНК, выделенной из кала	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	44
ВЫВОДЫ	45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	46

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БК – болезнь Крона

ВЗК – воспалительное заболевание кишечника

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

НК – нуклеиновая кислота

НЯК – неспецифический язвенный колит

ОКИ – острая кишечная инфекция

ОК – отрицательный контроль

ПК – положительный контроль

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РТ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РА – реакция агглютинации

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

РСК – реакция связывания комплимента

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

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) по уровню распространенности и заболеваемости значительно уступают другим заболеваниям внутренних органов. Однако по тяжести течения, частоте осложнений, инвалидизации и летальности они занимают одно из ведущих мест во всем мире в структуре заболеваний органов пищеварения. К ним относятся неспецифический язвенный колит и болезнь Крона.

Язвенный колит — хроническое заболевание, характеризующееся непрерывным воспалением слизистой оболочки толстого кишечника при отсутствии гранул в биопсийном материале с поражением прямой кишки и различным по протяженности поражением толстой кишки, имеющее рецидивное и ремиттирующее течение.

Болезнь Крона — гранулематозное воспаление кишки, характеризующееся развитием ее стеноза, образованием свищей и внекишечными проявлениями. Регионарные поражения могут возникать в любых отделах ЖКТ (Хруцкая, Панкратова, 2013).

ВЗК — патология индустриально развитых стран, и главным образом городского населения. Заболевания поражают преимущественно молодых людей (средний возраст заболевших — 20-40 лет), но могут начинаться в любом возрасте (Белоусова, 2002).

Воспалительные заболевания кишечника вызываются вирусами, простейшими или бактериями. Наиболее частыми возбудителями являются *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *C. fetus*, бактерии рода *Salmonella* и *Shigella*. При надлежащей диагностике кампилобактеры обнаруживаются в трети случаев (Flint et al., 2005).

Особенностью заболеваемости в нашей стране является трехкратное преобладание тяжелых осложненных форм ВЗК с высокой летальностью, что

связано с поздней диагностикой. При гистологическом исследовании биопсийного и аутопсийного материала трудно отличить от проявлений бактериальных инфекций – сальмонеллеза и шигеллеза.

Кампилобактеры, вызывающие патологию, обладают различными антигенными особенностями, вирулентностью, богатым спектром патогенности. *Campylobacter* — это один из видов микроорганизмов, способных к инвазивности, продуцирующий цитотоксические токсины, и до настоящего времени антигенная структура и роль *Campylobacter* недостаточно изучена.

В настоящее время для диагностики кампилобактериоза используют «золотой стандарт» - выделение и идентификация чистых культур. Однако, кампилобактерии микроаэрофилы, растут на сложных питательных средах, требуют высокой квалификации персонала. Диагностика усложняется разнообразием клинических проявлений кампилобактериоза. Все это приводит к недооценке истинной картины распространенности кампилобактериоза в структуре инфекционных заболеваний. Внедрение ПЦР-тестов в диагностических лабораториях может упростить и повысить эффективность диагностики кампилобактериозных инфекций (Шевцов и др., 2014).

Цель исследования. Разработка тест-системы для выявления *Campylobacter* spp. в клиническом материале у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника и оценка ее эффективности.

Задачи исследования

1. Сбор клинического материала.
2. Выделение ДНК из биоптатов кишечника у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.
3. Выбор родоспецифических праймеров при молекулярно-генетической идентификации.
4. Подбор оптимального метода генетической идентификации.

5. Сравнение результатов молекулярно-генетической детекции ДНК биоптатов с ДНК различных клинических материалов.

Научная новизна. Данная тест-система будет использоваться для выявления бактерий рода *Campylobacter* при воспалительных заболеваниях кишечника.

Практическая значимость. Предложенный подход позволит разработать оптимальный метод и наборы реагентов для пробоподготовки и ПЦР обнаружения *Campylobacter spp.* непосредственно в биоптатах, получаемых для гистологического исследования. Высокая аналитическая чувствительность и специфичность ПЦР тест-системы для выявления кампилобактерий позволяют использовать разработанный тест в экспресс-диагностике кампилобактериоза.

Область применения результатов исследования. Разработанная в ходе исследования методика демаскировки биоптатов может быть широко использована, так как не требует дорогих реактивов и не занимает много времени. Детекция бактерий рода *Campylobacter* может стать основой при постановке диагноза и дальнейшего лечения больных. Результаты проделанной работы могут быть применимы в медицине, лабораторной диагностике для выявления кампилобактерий и при назначении висмутсодержащих препаратов против них.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Микробиота кишечника

Желудочно-кишечный тракт – это комплексная экосистема, которая представлена ассоциацией резидентной микробиоты и клетками различных фенотипических линий эпителиальной стенки. Термин **микробиота**, предложенный Savage D.C., представляет собой коллективное сообщество бактерий на слизистых оболочках каждого индивидуума. Организм и сопровождающие его бактерии образуют единую симбиотическую систему (Нефедов и др., 2012).

Важнейшее значение в состоянии здоровья и самочувствии человека имеет микробиота кишечника. Это метаболический «орган», который участвует в процессе переваривания пищи, выделяет различные биологически активные вещества, стимулирует функции врожденного и приобретенного иммунитета, препятствует проникновению патогенных микроорганизмов, выполняет синтетическую, антиканцерогенную и детоксикационную функции (Кучумова и др., 2011).

Считалось, что кишечник новорожденного стерилен и колонизация ЖКТ микроорганизмами происходит после рождения. Новые исследования показали, что микроорганизмы присутствуют в плаценте, амниотической жидкости, пуповинной крови и меконии (Aagaard et al., 2014).

Слизистая оболочка кишечного тракта содержит высокую и многообразную плотность микробной обсемененности (до $1 \cdot 10^{14}$ КОЕ бактерий), в которой очень тонко сбалансировано взаимодействие между защитными системами организма и микробными ассоциациями (Жаркова и др., 2014). Наиболее густо заселен толстый кишечник. Концентрация микрофлоры кишечного содержимого составляет 10^{11} КОЕ/г (Беседнова, 2006).

Анаэробные бактерии отсутствуют в желудке, но представлены в дистальных отделах толстого кишечника. Микробные сообщества заселяют просвет кишечника, пространство между криптами, слизь, покрывающий эпителий и могут прикрепляться в нетипичных местах. Всего насчитывается около 1000 видов бактерий кишечной микробиоты. Желудочно-кишечную микробиоту составляют аэробные, факультативно-анаэробные и анаэробные бактерии. Соотношение анаэробной и аэробной микрофлоры возрастает, доминирование анаэробов от проксимального к дистальному отделу кишечника. На 99% толстый кишечник заселен анаэробами. Лишь 10% штаммов, выделенных из ЖКТ, могут быть культивированы и охарактеризованы (Джемилев и др., 2009).

Комменсальные бактерии кишечника выполняют полезные для организма функции. Иммунная система обеспечивает баланс в кишечнике и в норме не позволяет развиваться воспалительной реакции. В ходе проведения исследований с использованием новых технологий анализ многообразия комменсальных организмов в кишечнике человека и экспериментальных животных показал, что от состава микробиоты зависит предрасположенность к различным заболеваниям и ответ на проводимую терапию.

Иммунитет кишечника обеспечивают лимфоидные органы (Пейеровы бляшки и лимфатические узлы, специализирующиеся на обслуживании кишечника), арсенал клеток врожденного иммунитета и лимфоциты, продуцирующие защитные антитела.

В защите кишечника и регуляции состава микробиоты принимают участие в основном антитела IgA. Для их продукции В-лимфоциты, которые экспрессируют мембранно-связанные антитела типа IgM, попадают в отделы кишечника, связанные с иммунитетом и под воздействием микроокружения и растворимых факторов «переключаются» на выработку IgA, тем самым становясь плазматическими клетками (Круглов, Недоспасов, 2014).

Кишечная микробиота играет важную роль в нормальном функционировании кишечника и поддержании здоровья организма.

В любом отделе ЖКТ состав микробиоты в просвете кишки отличается от такового на поверхности слизистой оболочки (Codling et al., 2010). Если изучать микроорганизмы только в кале, то можно упустить из виду очень важную популяцию бактерий, которые адгезируются на поверхности слизистой оболочки (Eckburg et al., 2005).

1.2. Нарушение микробиоценоза при ВЗК

Человек и населяющие его микробы образуют единую микроэкологическую систему, где различные виды взаимодействия бактерий с клетками и тканями макроорганизма определяются не только видовым составом и концентрацией микроорганизмов, но и физиологическими, а также иммунобиологическими особенностями хозяина (Бондаренко, Мацулевич, 2006).

Неправильное питание матери во время беременности или ребенка в раннем возрасте может привести к обеднению и дефекту микробиоты кишечника. Есть предположение, что окончательное становление энтеротипа и фекотипа начинается с 18 месяцев. Примерно к 2-3 годам микробиота кишечника претерпевает последние изменения, формируется «взрослая» микробиота, 60-70% которой будет мало варьировать на протяжении всей жизни (Bergstrom et al., 2014).

Выделяют три вида энтеротипа по составу микробиоты. Каждый тип людей включает множество видов бактерий, вне зависимости от места проживания, состояния здоровья или возраста. Популяции бактерий объединены в кластеры по доминирующим в них родам. Первый тип – *Bacteroides*. Отличается активностью в отношении разложения углеводов, способствует выработке витаминов С, Н, В2, В5. Предполагают, что данный энтеротип будет реже подвержен атеросклерозу. Второй тип –

Ruminococcus. Они повышают эффективность всасывания углеводов, а также уровень сахара в крови. Синтезируют витамин B1 и фолиевую кислоту. Третий тип – *Prevotella*. Данные микроорганизму в процессе жизнедеятельности разрушают защитный слизистый покров, что, вероятно, предрасполагает к дефектам слизистой оболочки кишечника (Arumugam et al., 2011).

Идентификация определенного энтеротипа помогает учитывать особенности обменного процесса и выявлять предрасположенность к тем или иным заболеваниям (Budding et al., 2010).

Микробиота является высокостабильной экосистемой при отсутствии патологических факторов внешней среды. Вместе с человеком стареет и его микробиота. Недостаточное усвоение питательных веществ, которое связано с возрастными изменениями, приводит к изменению микробиоты. Снижение всасывания витамина B12, кальция, ионов железа способствует развитию атрофического гастрита. Снижение моторики ведет к копростазу, запорам, увеличению времени прохождения кала по кишечному тракту, накоплению белков бактерий и их брожению (Kashtanova et al., 2015).

Доказано, что нарушение баланса микробиоты кишечника играют роль в развитии ВЗК. При изучении микробного профиля кишечника у пациентов с БК и НЯК выявили снижение уровня бифидо- и лактобактерий, увеличение количества микроорганизмов, продуцирующих сероводород. *Fusobacterium spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.* и другие микроорганизмы блокируют процесс окисления жирных кислот, который приводит к энергодефициту в эпителиоцитах, стимулируют выработку противовоспалительных цитокинов, ингибируют фагоцитоз и лизис бактерий.

У больных, страдающих ВЗК, выявили уменьшение содержания *Firmicutes* и *Bacteroides*, являющиеся основными продуцентами короткоцепочечных жирных кислот, которые необходимы для

формирования слизистого барьера, экспрессии плотных контактов, энергообеспечения колоноцитов и регуляции иммунного ответа (Кузнецова и др., 2016).

За счет способности к адгезии и инвазии патогенных микроорганизмов, имеющих выросты нитевидной формы, расположенных на полюсах бактериальной клетки, облегчается проникновение микроорганизмов в слизистые оболочки кишечника. В свою очередь, интегрины, взаимодействуя с матриксными белками, облегчают «приклеивание» бактерий к клеткам-мишеням хозяина. Также истощение глутамина ведет к атрофии эпителия и в дальнейшем увеличению проницаемости эпителиального слоя (Poluektova et al., 2014).

У пациентов с ВЗК нарушена микробиота кишечника из-за воспаления стенок кишечника и постоянного приема медикаментозной терапии (Лягина и др., 2008). Данные сдвиги характеризуются исчезновением облигатных анаэробных микроорганизмов и развитием условно-патогенной флоры. По данным литературы, встречаемость нарушений микробиоты при ВЗК составляет 66-93% (Воробьев, Халиф, 2008).

1.3. Воспалительные заболевания кишечника

Воспалительная болезнь кишечника – группа идиопатических хронических воспалительных состояний кишечника, к которым относятся болезнь Крона и язвенный колит.

Болезнь Крона (БК) (регионарный энтерит, гранулематозный илеит или колит) - гранулематозное воспаление пищеварительного тракта неизвестной этиологии с преимущественной локализацией в терминальном отделе подвздошной кишки; характеризуется стенозом пораженных участков кишки, образованием свищей и внекишечными проявлениями. Описана В.В. Crohn, L. Ginsberg, G.D. Oppenheimer в 1932 году. БК

рассматривается как хроническое трансмуральное воспаление, которое может вовлекать любой отдел пищеварительного тракта от ротовой полости до анального канала, сочетаясь со многими внекишечными проявлениями (Румянцев, 2007).

Распространенность БК в России в целом не изучалась, однако исследование, проведенное в Московской области, позволяет предположить, что частота БК в Европейской части России примерно равна частоте в Центральной Европе и составляет 3,5 на 100000 населения (Халиф, Лоранская, 2004).

Неспецифический язвенный колит (НЯК) - некротизирующее воспаление слизистой оболочки толстой кишки неспецифического характера неизвестной этиологии, распространяющееся от анального канала в проксимальном направлении (Адлер, 2001).

Распространенность НЯК по Московской области составляет 22,3 на 100 тыс. населения, заболеваемость - 1,7 на 100 тыс. населения (Никулина и др., 1997).

ВЗК из-за своей распространенности, хронического и тяжелого течения получили важное медико-социальное значение. По тяжести течения, частоте осложнений и летальности они во всем мире занимают одно из ведущих мест в структуре болезней ЖКТ. Заболеваемость БК и ЯК возрастает с каждым годом из-за отсутствия единого взгляда на проблему ВЗК, поздней диагностики и неадекватного лечения (Бехтерева и др., 2012).

Распространенность ВБК выше в урбанистических областях и среди более обеспеченных социально-экономических слоев населения (Bernstein et al., 2015).

Выделяют следующие гипотезы:

- Различие частоты ВБК между развитыми и развивающимися нациями — «гипотеза гигиены» - частота хронических иммунных заболеваний, в том числе и ВБК, выше у людей, менее предрасположенных

детским инфекциям или антисанитарным условиям, теряют потенциально «дружественные» микроорганизмы и микроорганизмы, способствующие развитию регуляторных Т-клеток. По данной причине не развивается иммунный спектр (Sood et al., 2014).

- Распространение западной диеты и стиля жизни, включая и применение подходов к лекарственному лечению и вакцинации.
- В развитых странах ЖК чаще встречается по сравнению с БК (Ng et al., 2015).

В нынешнее время считают, что при ВЗК имеют смысл совокупные отношения между микробными, генетическими факторами, факторами окружающей среды, которые могут содействовать непрерывной активации иммунной системы слизистых оболочек, и в данном случае кишечная микробиота является важным этиологическим звеном патогенеза при таких патологических состояниях (Endo et al., 2009). Течение основного заболевания может ухудшаться из-за дисбаланса в микробиоте толстой кишки, который в свою очередь ведет частым рецидивам и осложнениям (Zwolinska-Wsislo et al., 2009).

Помимо микробного фактора экспериментально учеными доказано, что при ВЗК имеет место генетически детерминированная нарушенная регуляция иммунного ответа слизистой оболочки кишечника на антигены нормальной микробиоты (Farrell, 2002). Только в присутствии бактериобиоты в просвете кишки возможно развитие воспаления слизистой оболочки, а изъязвление невозможно в условиях стерильного пищеварительного тракта (Swidsinski et al, 2002).

1.4. Общие представления о бактериях рода *Campylobacter*

В структуре ВЗК ведущее место занимает бактериальная инфекция. В последние годы появляются данные о росте заболеваемости кампилобактерной инфекцией (Мазанкова, Перловская, 2015).

По данным НИИ, с расширением диагностических возможностей доля кампилобактериоза увеличилась с 1,5% в 2000г. до 18% -в 2005 (Тихомирова и др., 2006).

Кампилобактериоз – острое инфекционное зоонозное заболевание с фекально-оральным механизмом передачи, которое вызывается *Campylobacter spp.* В странах Евросоюза в 2010-2012 гг. 99,6% случаев кампилобактериоза было вызвано *C. jejuni* (93,1%), *C. coli* (6,5%) и на долю других видов приходится 0,4% (Порин, 2016). Кампилобактериоз характеризуется различной степенью тяжести проявления заболевания и полиморфностью клинических проявлений.

Род *Campylobacter* вызывает кампилобактериозы у людей, животных и птиц, с преобладающим тропизмом к желудочно-кишечному тракту и репродуктивной системе. Характеризуется различной степенью тяжести проявления заболевания и полиморфностью клинических проявлений (Шевцов и др., 2014).

Бактерии рода *Campylobacter* на данный момент рассматриваются как одна из основных причин острых кишечных инфекций бактериальной этиологии у жителей развитых стран, превышая в некоторых регионах частоту регистрации сальмонеллеза и шигеллеза. Заболеваемость кампилобактериозом в странах Европы и Северной Америки носит спорадический характер, но также описаны крупные пищевые и водные вспышки, имеются сообщения о внутрибольничных очагах кампилобактериоза. При целесообразной диагностике кампилобактеры выявляются в трети случаев «диарей путешественников» среди жителей экономически развитых стран, посещающих регионы с высокой степенью циркуляции кампилобактеров среди населения (Flint et al., 2005). В России из-за трудностей бактериологической диагностики верификация кампилобактериоза находится на низком уровне.

Кампилобактеры – мелкие, не образующие спор грамотрицательные, слегка изогнутые палочки в виде запятых, крыльев «чайки в полете» или

спиралевидной, S-образной формы, длина 0,5-0,8 мкм, ширина 0,2-0,5 мкм, имеют один или два жгутика, подвижны, обладают способностью к быстрым винтообразным движениям (по данным фазово-контрастной или темнопольной микроскопии). Концы бактериальных клеток обычно утончены. Очень склонны к влиянию окружающей среды и относительно быстро погибают при воздействии неблагоприятных для них внешних условий – высушивание, нагрев, кислая среда, дезинфицирующие средства и т.п. При контакте с воздухом, воздействии повышенной температуры и старении культур появляются сферические бактериальные клетки. Трудно культивируемы, так как растут в микроаэрофильных условиях на агаровых средах с добавлением 1% глицерина, образуя мелкие колонии. Оптимальной температурой для роста является 37°C, pH 7,0. Образуют сероводород, не разжижают желатин, не свертывают молоко, не вызывают гемолиза и дают положительную реакцию на каталазу. Имеют термостабильный О-антиген и термолабильный Н-антиген (Горелов, 2004).

Кампилобактериоз регистрируется в течение всего года, но на летние месяцы приходится сезонный подъем заболеваемости. Наблюдаются как спорадические, так и групповые случаи заболевания. Основным путем распространения инфекции – пищевой, причем ведущим фактором передачи является инфицированное мясо (говядина, свинина, мясо птицы), где кампилобактерии хорошо сохраняются и при благоприятных условиях интенсивно размножаются. Гораздо меньше инфекция передается водным и контактно-бытовым путем. Яйца домашних птиц безопасны, так как показана низкая вероятность вертикального заражения птиц. Также передатчиками инфекции могут служить комнатные животные – собаки, кошки, хомячки (Denno et al., 2005).

Заболевание встречается во всех возрастных группах. У взрослых кампилобактериоз чаще наблюдается среди лиц, профессионально связанных с животноводством и птицеводством. Возможно заражение новорожденного интранатальным путем, также трансплацентарная

передача инфекции плоду, которая может привести к прерыванию беременности на любых сроках.

1.5. Эпидемиология

Кампилобактерии характеризуются высокой вирулентностью, их инфекционная доза составляет 500 бактерий, поэтому для человека может быть опасной даже контаминация порядка 4 КОЕ/г мяса. Основным источником инфекции являются сельскохозяйственные и домашние животные, птицы (в том числе водоплавающие), редко человек. Механизм передачи – фекально-оральный, пути передачи – пищевой, водный, контактно-бытовой или половой. Случаи заболевания регистрируются в течение всего года, но чаще в летне-осенние месяцы. Наблюдаются спорадические и групповые случаи заболевания. Факторами передачи инфекции служат разнообразные пищевые продукты животного происхождения (мясо птицы, говядина, свинина, молоко и другие), не прошедшие достаточной термической обработки или вторично контаминированные вследствие нарушения технологии приготовления, несоблюдении условий и сроков хранения и реализации продукции. Вакуумная упаковка пищевых продуктов, полуфабрикатов и готовых блюд способствует выживаемости кампилобактеров, а также их размножению. Кампилобактеры, являясь микроаэрофилами, не обладают способностью длительно выживать во внешней среде при контакте с кислородом, однако они хорошо сохраняются в водной среде при низких температурах. Поэтому на территориях, где не решены вопросы подачи населению безопасной питьевой воды, преобладающим становится именно водный путь передачи инфекции. Заболевания возникают при потреблении сырой воды из открытых водоемов, контаминированных кампилобактерами, а также из аварийных водопроводных сетей, загрязненных канализационными выбросами, стоками мясокомбинатов, объектов

птицеводства и животноводства. Бытовой путь передачи реализуется при прямом контакте с инфицированными животными (особенно с курами), у которых часто наблюдается бессимптомное носительство возбудителя. Описаны случаи передачи возбудителя контактно-бытовым путем среди членов семьи или в специализированных закрытых лечебных учреждениях, что объясняется низкой инфекционной дозой патогена.

Заболевание встречается во всех возрастных группах, чаще всего инфицированию подвержены дети до 3-5 лет, дети старшего возраста и молодые. Среди взрослого населения в группе риска находятся люди профессионально связанные с животноводством и птицеводством.

1.6. Маркеры кишечного воспаления при заболеваниях кишечника

Использование маркеров активности кишечного воспаления является неинвазивным методом диагностики.

Для основной методики применяли тест на выделение с калом гранулоцитов, меченных индием, но высокая стоимость и опасность лучевого воздействия на пациента ограничили его использование в клинической практике. Также эстераза лейкоцитов, интерлейкин 1 β , антагонист рецептора интерлейкина 1, фактор активации тромбоцитов, катионный белок эозинофилов были вытеснены из клинической практики. Их концентрация увеличивалась при обострении БК и НЯК, но быстро разрушались протеолитическими ферментами, содержащимися в кале.

Условной устойчивостью в стуле обладает α 1-антитрипсин. Этот гликопротеин синтезируется в печени, не разрушается панкреатическими ферментами и бактериями, не адсорбируется в кишечнике. Его концентрация увеличивается при ВЗК, но он является косвенным маркером желудочно-кишечного воспаления. Высокая концентрация

возникает из-за повышенной проницаемости стенки воспаленной кишки для плазменных белков (Татьянина и др., 2008).

Одним из наиболее эффективных маркеров является фекальный кальпротектин. Впервые он был выделен из гранулоцитов в 1980 году и получил название L1-протеин. Кальпротектин относится к группе кальций-связанных белков семейства S100 (S100 A8/A9) и состоит из одной легкой и идвух тяжелых полипептидных цепей, с общей молекулярной массой 36,5 кДа (Fagerhol et al., 1990).

Фекальный кальпротектин (ФК) в большом количестве содержится в нейтрофилах и составляет до 60% белка цитоплазмы и 5% общего количества белка нейтрофила. Также обнаруживается в макрофагах и моноцитах. Кальпротектин обладает бактериостатическим и фунгицидными свойствами, за счет конкурентного связывания цинка (Sohnle et al., 1996). По литературным данным, в условиях воспаления концентрация кальпротектина плазмы крови увеличивается в 5-40 раз (Lugering et al., 1995). Повышенные концентрации кальпротектина можно определить в синовиальной жидкости, моче и фекалиях (Roseth et al., 1992). У больных ВЗК в образцах стула концентрация ФК приблизительно в 6 раз больше, чем в плазме крови и напрямую зависит от активности оспалительного процесса в кишечнике (Roseth et al., 1997). Увеличение уровня ФК является результатом усиленной миграции нейтрофилов через воспаленную слизистую оболочку кишки (Roseth et al., 1999).

Как потенциальный маркер локального воспаления в кишечнике ФК имеет ряд преимуществ: он не подвержен воздействию протеолитических ферментов и его концентрация не изменяется даже при хранении кала в течение 7 дней при комнатной температуре. Методом ИФА можно определить уровень ФК даже в 50 мг образца стула.

1.7. Диагностика кампилобактерий

Полиморфизм клинических проявлений у животных и людей не дает возможности поставить диагноз «кампилобактериоз» без лабораторного подтверждения. Микробиологическая диагностика трудоемкая, многозатратная, процедура, что связано с биологическими свойствами возбудителя (Silina et al., 2011).

Для диагностики кампилобактерий используют бактериоскопию, серологические анализы и ПЦР-анализ.

Кампилобактерии проявляют высокую чувствительность к сопутствующей кишечной микрофлоре и ее кислым продуктам метаболизма, а также обычным атмосферным условиям. Поэтому пробы фекалий должны доставляться в лабораторию в охлажденном виде (4-6 °C) в течение срока, не превышающего 1 ч после совершения животным акта дефекации. В качестве альтернативы можно брать у животных, подозреваемых в заражении КБ, смывы из прямой кишки (у птиц — из клоаки). При необходимости более длительной транспортировки (до 24 ч) патологического материала применяют транспортные среды: тиогликолятно-цистеиновую, Керри-Блеера и др. Они не только поддерживают жизнеспособность КБ, но и задерживают рост сопутствующей микрофлоры (Шуляк, 2008).

Для обнаружения кампилобактерий микроскопию мазков фекалий проводят посредством темнопольной и фазово-контрастной микроскопии. Исследуют разведенные пробы фекалий. Их визуальной идентификации в препаратах способствует характер двигательной активности и форма бактериальной клетки. Окраску мазков фекалий лучше всего проводить карболфуксином.

Реакция непрямой иммунофлюоресценции является наиболее чувствительным и специфичным методом обнаружения кампилобактерий в нативном материале. Используется как ориентировочный экспресс-метод

диагностики, так как может дать неспецифический отрицательный результат при низкой концентрации кампилобактерий в фекалиях.

Иммуноферментный анализ предназначен для быстрого обнаружения в фекалиях антигенов кампилобактерий. Чувствительность метода составляет 89-99%, но не позволяет дифференцировать между собой термофильные виды кампилобактерий (Hindiye et al., 2000).

Вестерн блот дает возможность обнаружить 7 антигенов кампилобактерий, которые имеют молекулярную массы от 14 до 67 кД. Наибольшую диагностическую ценность имеет выявление антигенов с молекулярной массой 29, 37 и 43 кД (Janvier et al., 2000).

Идентификация кампилобактерий основана на характере их биохимических и культуральных свойств, результатах серотипирования, фаготипирования и анализа генома.

Использование биохимических маркеров для дифференциации кампилобактерий затруднена из-за отсутствия способности к активному метаболизму углеводов. Биохимические тесты желательно проводить в следующей последовательности: определение каталазной и оксидазной активности, способности гидролизовать гипурат натрия, образовывать сероводород на среде с цистеином и индол, ферментировать углеводы и восстанавливать нитраты.

Типирование по культуральным свойствам проводят на среде МакКонки, которая позволяет дифференцировать *C. jejuni*, *C. coli* от *C. upsaliensis*, которая на ней не растет. При анализе культурально-морфологических свойств учитывают подвижность, форму и размер бактериальных клеток, рост на средах без крови, при 25, 37, 42 °C, в присутствии 3,5% NaCl или 1% глицина, морфологию колоний. Также проводится тестирование изолятов на чувствительность к цефалотину (Nachamkin et al., 1995).

Серотипирование кампилобактерий проводится по термолабильному поверхностному антигену HL в реакции агглютинации, растворимому

термостабильному О-антигену в реакции непрямой гемагглютинации или реакции агглютинации, либо жгутиковому антигену flaA. По термолабильному антигену различают 108 серогрупп *C. jejuni*, *C. coli* суммарно, а по О-антигену 47 и 18 серогрупп. Основным недостатком серотипирования является большое количество нетипируемых штаммов кампилобактерий.

Из молекулярных способов типирования наибольшее применение нашли южный и дот блоттинги. Они позволяют точно и быстро анализировать геном. При проведении южного блоттинга геном изолята фрагментируют рестриктазами на участки определенной длины. Затем их разделяют в электрофорезе в соответствии с размером и переносят с геля на фильтр. Проводят гибридизацию фрагментов. Постановка дот блоттинга дает возможность извлечь нуклеиновую кислоту из бактериальной клетки с последующим переносом на фильтр и проведением гибридизации нерадиоактивными зондами.

Риботипирование по локусам 5S, 16S, 23S рРНК является наиболее удобным для типирования изолятов кампилобактерий, которых невозможно идентифицировать по фенотипу (Goossens et al., 1995).

Низкая эффективность бактериологических методов диагностики кампилобактериоза указывает на перспективность разработки и внедрение ПЦР-тестов для выявления клинически значимых видов кампилобактерий (Шевцов и др., 2014).

Полимеразную цепную реакцию первоначально проводили на основе амплификации генов 16S рРНК. По чувствительности такой вариант реакции превосходит культуральный метод, но не позволяет проводить межвидовую дифференциацию кампилобактерий.

После обнаружения у термофильных кампилобактерий специфического участка 23S рРНК олигонуклеотидные праймеры последнего были с успехом использованы для обнаружения в фекалиях и дифференциации этих микроорганизмов.

Третий вариант реакции основан на использовании в качестве праймера участка размером 153 нуклеотида одного из доменов ГТФ-азы *C. jejuni*. Тест позволяет дифференцировать все термотолерантные виды кампилобактерий (Шуляк, 2008).

ПЦР с использованием универсальных олигонуклеотидных праймеров, комплементарных повторяющимся последовательностям и характерных для различных прокариотических геномов, позволяет анализировать целостность генома без предварительного изучения ДНК-последовательности кампилобактерий.

ПЦР значительно эффективнее для выявления *Campylobacter spp.*, чем традиционные бактериологические методы (Соколова и др., 2016).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клиническое и лабораторное обследование больных

В соответствии с целью исследования клинико-лабораторный отбор пациентов проводился из числа госпитализированных в ГБУЗ РБ «Городская клиническая больница» № 21 г. Уфы в 2017-2018 годах.

В качестве клинического материала использовались биоптаты толстой кишки, полученные при колоноскопии и участки толстой кишки, оперированных по поводу НЯК. Эндоскопические биопсии и операционный материал подвергнуты стандартному гистологическому исследованию после заливки в парафин. Диагноз был установлен на основании общепринятых клинических, эндоскопических, гистологических и рентгенологических критериев.

Также клиническим материалом был кал, собранный у 54-ти пациентов среднетяжелыми формами острой кишечной инфекции. В анамнезе диарея по типу гастроэнтерита. Для постановки диагноза использовались клинические, бактериологические и иммунологические методы.

2.2. Депарафинизация и выделение ДНК из биоптатов

Наиболее доступным клиническим материалом для анализа является ткань, фиксированная в формалине и заключенная в парафин (ТФП). Однако выделение пригодной для анализа ДНК из такого материала затруднен рядом причин. Под действием низких рН фиксирующего раствора формалина происходит частичная деградация ДНК, а также образуются ковалентные связи ДНК с белками. Одним из мешающих факторов для проведения ПЦР является содержание в образцах ингибиторов и примесей парафина.

Блоки ТФП ткани толстого кишечника получены из ГБУЗ РБ «Городской клинической больницы» № 21 г. Уфы. Из каждого блока готовили тонкие срезы и помещали в эппендорфы. Данный способ депарафинизации биоптатов основан на быстром лизисе тканей, избавлении от парафина и осаждении ДНК этанолом. Преимуществами данного метода являются отсутствие органических растворителей и в несколько раз более низкая стоимость (Писарева и др., 2015).

Общая схема состоит из трех этапов:

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

Для лизирования заранее подготовили растворы. Ткань лизировали в 200 мкл раствора 0,1 М NaOH – 0,5% SDS при 95° в течение 30 минут. Затем добавили 3 М ацетата натрия с рН 5,0 до конечной концентрации 0,3 М для нейтрализации. Смешивали на вортексе в течение 5-10 секунд. Использовали метод вымораживания при температуре - 20°C 5 минут для застывания парафина. Жидкий лизат из-под слоя застывшего парафина переносили в новые промаркированные эппендорфы и использовали для выделения ДНК.

ДНК очищали спиртовым осаждением. Для этого к раствору ДНК после лизиса добавляли два объема изопропанола, центрифугировали 2 мин при 5000 об/мин. Супернатант переносили в новые эппендорфы и осаждали ДНК центрифугированием 5 мин при 10000 об/мин. Далее изопропанол удаляли с помощью фильтровальной бумаги, а осадок промывали 1 мл 96% этанола и растворяли в 100 мкл воды.

2.3. Выделение ДНК из биоптатов набором «ДНК-сорб-С».

Еще одним способом выделения ДНК из биоптатов было использовали набора реагентов «ДНК-сорб-С». Он предназначен для выделения: тотальной ДНК из микробиоптатов кожи и слизистых оболочек (мочеполовой системы, ЖКТ, бронхов) и паренхиматозных органов (пунктаты печени, селезенки), а также из гомогенизированных тканей. Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 биоптатов размером 10-25 мм³ (мкл); ДНК из пищевых продуктов, биологических добавок, кормов для животных или растительного сырья, включая контроли.

Перед началом работы ознакомились с прилагаемой инструкцией, подготовили все необходимое. Буфер для лизирующего реагента и раствор для отмывки 1 прогревали при температуре 64 °С до полного растворения кристаллов, так как набор хранился в холодильнике при температуре от 2 до 8 °С. Отбирали 43 одноразовых полипропиленовых пробирок объемом 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками, включая отрицательный и положительный контроли. Промаркировали все пробирки.

Сначала во все пробирки внесли по 10 мкл ВКО. Добавляли по 400 мкл буфера для лизирующего реагента и по 17 мкл лизирующего реагента. Затем согласно маркировке в приготовленные пробирки вносили по 100 мкл исследуемых образцов, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции закапали 100 мкл ОКО, в пробирку положительного контроля (ПК) экстракции - 90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО. Плотнo закрыв крышки, тщательно перемешали и осадили капли на вортeксе. Пробирки помещали в термостат с температурой 64 °С на 1 ч, периодически перемешивая на вортeксе (5 раз через каждые 10–12 мин).

После инкубации нерастворенные частицы образцов осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 10 тыс об/мин.об/мин . В

промаркированные эппендорфы очень аккуратно отдельными наконечниками с фильтрами отбирали надосадочную жидкость в объеме 300 мкл. Капли осаждали на вортексе.

Сорбент универсальный ресуспендировали, интенсивно перемешивая на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавляли по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Плотнo закрыв крышки, перемешивали на вортексе и оставили в штативе на 10 мин, перемешивая через каждые 2 мин. Процентрифугировали пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 2 тыс об/мин. Не захватывая сорбент, удаляли надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Затем добавляли в пробирки по 300 мкл раствора для отмывки 1, плотно закрыв крышки, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Процентрифугировали пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 2 тыс об/мин. Не захватывая сорбент, удаляли надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Добавляли в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 2, плотно закрыв крышки, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 7 тыс об/мин. Не захватывая сорбент, удаляли надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Повторяли процедуру отмывки, удаляя надосадочную жидкость полностью.

Для подсушивания сорбента универсального пробирки с открытыми крышками помещали в термостат с температурой 64 °C на 5–10 мин. В пробирки добавляли по 50 мкл буфера для элюции В. Перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Помещали в термостат с температурой 64 °C на 5–10 мин, периодически (1 раз в мин) перемешивая

на вортексе. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 10 тыс об/мин.

Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР. Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 мес и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для этого, не захватывая сорбент, переносили надосадочную жидкость в новую пробирку и хранили в морозильной камере.

2.4. Выделение ДНК из кала

В связи с поставленной задачей проводили экстракцию ДНК из клинического материала. Всего было 54 образцов кала с ОКИ, ВЛ слепой кишки и дисбактериоз. Для этого использовали комплект реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В».

Данный метод основан на том, что клинический образец обрабатывается лизирующим раствором в присутствии частиц силики – сорбента. В результате происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК связывается с частицами сорбента, а другие компоненты клинического материала остаются в лизирующем растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и дальнейшей отмывкой. После добавления раствора для элюции ДНК к сорбенту, ДНК с поверхности силики переходит в раствор. Он отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате получается высокоочищенный препарат ДНК без ингибиторов, что в свою очередь обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

Перед началом работы ознакомились с прилагаемой инструкцией, мерами предосторожности, дополнительным материалом и

оборудованием, с правилами взятия, транспортировки и хранения исследуемого материала для работы с данным набором.

Ход работы

1. Сначала лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 прогревали при температуре 65°С до полного растворения кристаллов.

2. Отбирали необходимое количество одноразовых пробирок. Промаркировали их. В каждую пробирку внесли по 10 мкл ВКО и по 300 мкл лизирующего раствора.

3. В эти пробирки аккуратно вносили по 100 мкл проб, используя наконечники с фильтром, не касаясь стенок пробирки. В пробирку ОК экстракции вносили 100 мкл ОКО.

4. Пробы тщательно перемешивали на вортексе и прогревали 5 мин при температуре 65°С. Центрифугировали 5 секунд при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге до полного растворения пробы.

5. Тщательно ресуспендировали сорбент универсальный на вортексе. И в каждую пробирку отдельным наконечником добавляли по 25 мкл. Перемешивали на вортексе, поставив в штатив на 2 мин, затем еще раз перемешивали и оставляли в штативе на 5 мин.

6. Сорбент осаждали центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 секунд. Удаляли надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

7. В пробы добавляли по 300 мкл раствора для отмывки 1 и перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования универсального сорбента. Сорбент осаждали центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 секунд. Удаляли надосадочную жидкость.

8. Затем добавляли по 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешивали на вортексе, центрифугировали 30 секунд при 10 тыс об/мин, удаляли надосадочную жидкость. Данный процесс повторяли дважды.

9. Пробирки с открытыми крышками помещали в термостат при температуре 65°С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального.

10. В каждую пробирку добавляли по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Перемешивали на вортексе. Помещали в термостат при температуре 65°С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

11. Пробирки центрифугировали при 12 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. В данном виде ДНК хранится в течение недели при температуре от 2 до 8°С, поэтому отбирали надосадочную жидкость в чистые промаркированные эппендорфы.

2.5. Праймеры, использованные в исследовании

Нами было проанализировано большое количество материала, в том числе различные научные статьи. В результате нашли статью 2017 года, где описано выявление бактерий рода *Campylobacter spp.* в мясе убойных животных.

В оригинальной научной статье «Концептуальные подходы к экспресс-выявлению *Campylobacter spp.* в мясе убойных животных» под редакцией Батаевой Д.С., Минаева М.Ю., Юшиной Ю.К., Сокловой О.В., Зайко Е.В., опубликованной в «Theory and Practice of Meat Processing №4» в 2017 году описан процесс подбора праймеров. При подборе родоспецифичных праймеров по базе данных NCBI была выбрана более консервативная последовательность 16S рПНК ITS, т.к. конститутивные гены *Campylobacter (housekeeping genes)* обладают высокой видовой специфичностью (табл.1). Расчет чувствительности и эффективности ПЦР реакции с родоспецифичными праймерами проводился с использованием ряда десятикратных разведений ДНК. Подобранные праймеры имели 100% сходимость к геному бактерий рода *Campylobacter*, эффективность ПЦР составлял не менее 95%, предел обнаружения не более 1×10^4 КОЕ/г.

При оценке специфичности праймеров учитывалось, что бактерии рода *Campylobacter* могут встречаться в смешанной культуре с бактериями родов *Proteus* и *Aeromonas*, поэтому была проведена межродовая диагностика ПЦР реакцией с выбранными праймерами. Установлено, что подобранные праймеры обладали 100% специфичностью и не давали ложноположительных реакций с указанной группой микроорганизмов. Разработанная тест-система была успешно проверена в раунде сличительных испытаний в системе FEPAS и внедрена в лабораторную практику. Доказано, что разработанную тест-систему можно использовать как при скрининге на этапах обогащения бактерий рода *Campylobacter*, так и при идентификации чистой культуры микроорганизма (Батаева и др., 2017).

Таблица 1. Первая пара праймеров, использованная в работе, и их характеристика (Батаева и др., 2017)

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймеров	Тем. отжига	Ожид. размер продукта (пн)
CampF	5' – GTTAAGTCCCGCAACGAGC-3'	58°C	273
CampR	5'–GGCTGATCTACGATTACTAGCGA-3'		

Подобранные родоспецифичные праймеры из статьи использовали для своего исследования и проверяли на наших исследуемых биоптатах.

Параллельно применяли вторую пару праймеров, которые были подобраны с помощью ресурса GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), которые также прошли проверку по всем критериям и были использованы в практике в рамках дипломной работы выпуска 2017 года (Бижбалова и др., 2018, , в печати) (табл.2). Данная процедура проводилась для контроля.

Кроме того, для контроля выделения ДНК из клинического материала были использованы праймеры на наличие β -актина – глобулярного белка человека (табл.3).

Таблица 2.Вторая пара праймеров, использованная в работе, и их характеристика

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

Таблица 3. Праймеры на наличие β -актина в образцах клинического материала, и их характеристика

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймеров	Тем. отжига	Ожид. размер продукта (пн)
GAPDH F	5' – TCAAGACCTTGGGCTGGGACTGG -3'	63°C	158
GAPDH R	5'– ACGCAAAAGAAGATGCGGCTGACTGT -3'		

2.6. Амплификация участков ДНК методом полимеразной цепной реакции

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – искусственный процесс многократного копирования (амплификации) специфической последовательности ДНК, который осуществляется *in vitro*. Копирование ДНК, как и в клетках живых организмов, осуществляется специальным

ферментом – ДНК-полимеразой. Она, двигаясь по матрице (одиной цепи ДНК), синтезирует комплементарную ей последовательность. Для начала синтеза цепи ДНК необходима короткая «затравочная» цепь РНК или ДНК, к которой ДНК-полимераза может присоединять нуклеотиды.

Основной принцип ПЦР состоит в том, что реакция синтеза полимерной цепи ДНК из мономерных нуклеотидных звеньев инициируется специфическими праймерами в каждом из множества повторяющихся циклов. Специфичность ПЦР основана на принципе молекулярной комплементарности и способности праймеров «узнавать» строго определенный участок ДНК.

Для проведения ПЦР требуются следующие компоненты:

1. ДНК-матрица – выделенная ДНК анализируемого образца, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
2. Праймеры (Forward и Reverse) - короткие синтетические олигонуклеотиды длиной 18—30 оснований, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК. Игрют ключевую роль в образовании продуктов реакции и обеспечивают чувствительность и специфичность реакции. Для ПЦР используют 2 праймера, которые ограничивают с двух сторон последовательность.
3. Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, катализирующий реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.
4. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) - смесь четырех нуклеотидных оснований, «строительных блоков» для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.

5. Буферный раствор - реакционная среда, содержащая различные ионы, в том числе ионы Mg^{2+} , необходимые для поддержания оптимальной активности и стабильности фермента, обеспечивающий необходимые условия реакции.

С помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований.

В обычной ПЦР используют пару праймеров, которые «ограничивают» амплифицируемый участок с двух сторон, связываясь с противоположными цепями ДНК-матрицы. Для многократного увеличения необходима цикличность реакции. ПЦР состоит из трех этапов:

1) денатурации, или «плавления ДНК, когда двухцепочечная ДНК под действием высокой температуры $95^{\circ}C$ переходит в одноцепочечное состояние.;

2) отжига праймеров с матричной ДНК. Происходит присоединение праймеров к ДНК-мишени с образованием коротких двухцепочечных участков ДНК, необходимых для инициации синтеза ДНК;

3) элонгации, или удлинения цепи.

Смена этапов каждого цикла осуществляется путем изменения температуры реакционной смеси. Сначала праймеры связываются только с определенной последовательностью исходной ДНК, но в последующих циклах они связываются с копиями этой последовательности, которые были синтезированы в предыдущих циклах. Вследствие этого, количество основного продукта ПЦР теоретически удваивается в каждом цикле.

Материалы и оборудование

1. Амплификацию участков ДНК осуществляют с использованием стандартных наборов на амплификаторе «Терцик МС-2» с возможностью программирования и контроля за процессом без использования персонального компьютера.

2. ПЦР бокс БАВ-ПЦР- «Ламинар.-с»
3. Микроцентрифуга-вортекс FV-2400
4. Дозаторы «Колор» (0.5-10 мкл; 5-50 мкл (2 шт); 20-200 мкл; 100-1000 мкл)
5. Штатив для эппендорфов
6. Наконечники с фильтром
7. Реакционная смесь
8. Раствор Taq-полимеразы
9. Минеральное масло
10. Положительный контрольный образец

Ход работы:

1. Располагали в штативе буфер Taq-полимеразы, дНТФ, растворы праймеров для разморозки, после ресуспендировали на вортексе. Taq-полимеразу хранили в холодильнике.
2. Отбирали нужное количество одноразовых пробирок объемом 0.6 мл, маркировали и расставляли в штатив.
3. Готовили амплификационную смесь для анализируемых проб в пробирке на 1,5 мл и разливали по 22 мкл в каждую пробирку для амплификации на 0.6 мл.
4. В каждую пробирку вносили по 3 мкл ДНК исследуемого образца с наконечниками с фильтром.
5. На поверхность каждой реакционной смеси наносили 1 каплю минерального масла во избежание испарения жидкости.
6. Пробирки закрывали, центрифугировали 5 сек при 3000 об/мин на микроцентрифуге-вортекс.
7. Все пробирки устанавливали в детектирующий амплификатор.
8. На ДНК амплификаторе запускали заранее настроенную программу.
9. Проводили 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: Мы установили в программе 30 циклов.

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. В основном, реакция протекает при 68-72°C, 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°C – 20 сек | } | 30 циклов |
| 2. Отжиг – 58°C – 20 сек | | |
| 3. Элонгация – 72°C – 30 сек | | |
| 4. Хранение – 10°C | | |

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

2.7. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле

Электрофорез в гелях – метод разделения макромолекул, различающихся по размеру или молекулярной массе, пространственной конфигурации, вторичной структуре и электрическому заряду.

Перед заливкой геля при помощи регулировочных винтов установили подставку для лотка. Поместили лоток для геля одной из открытых его сторон вплотную к неподвижной стенке держателя и зафиксировали. Установили гребенки, фиксируя их в соответствующих пазах по бокам лотка. Для приготовления геля в СВЧ-печи расплавили смесь агарозы, буфера и воды (1,2 г агарозы, 2мл 50х ТАЕ буфера и 100мл очищенной воды) до полного растворения, периодически помешивая. Охлажденную до 50-60° смесь тонким слоем залили в чистую форму, толщиной не более 5 мм. После затвердения геля при комнатной температуре, спустя 15-20 минут аккуратно удалили гребенку, стараясь не повредить образовавшиеся лунки. Отодвинули подвижную стенку держателя к краю подставки, ослабили винты и достали лоток с гелем. Поместили в установленную горизонтально камеру, располагая лунки для проб со стороны катода (чёрный электрод). В ходе электрофореза

отрицательно заряженная ДНК будет двигаться к аноду. Затем залили достаточным количеством 0,5x TBE буфера, чтобы гель был покрыт слоем буфера около 3-5 мм.

Для подготовки образцов отбирали 10 мкл раствора ДНК из эппендорфа на пластинку для нанесения проб. Добавляли 3 мкл красителя бромфенолового синего с ксиленцианолом и глицерином. Перемешивали пипеткой. Наносили автоматической пипеткой 10 мкл каждого образца с красителем в последовательно расположенные лунки. Закрыли крышку электрофоретической камеры и подсоединили электропровода, таким образом, чтобы ДНК перемещалась в сторону анода. Включали источник питания и устанавливали напряжение 100 вольт. Разделение ДНК проводили в течение 20 минут. Отключали ток, отсоединяли провода и крышку электрофоретической камеры. Вынимали пластинку с гелем и помещали ее в кювету для окрашивания. Наливали в кювету слабый раствор бромистого этидия. Окрашивали в течение 5-7 мин. Сливали краситель в колбу. Промывали гель проточной водой. Помещали его на фильтр УФ трансиллюминатора. Фотографировали гель на фотосистеме Gel Camera System (UVP, Inc. США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Выделение ДНК

Для проверки качества выделенной ДНК после демаскировки 1-ым и 2-ым способом был проведен ПЦР в режиме реального времени с праймерами на наличие β -актина (глобулярного белка человека).

В результате выделение ДНК из ТФП, описанная Писаревой с соавт. (2015), также как и с помощью набора реагентов «ДНК-сорб-С» оказалась эффективной, с той лишь разницей, что сам процесс выделения с помощью набора «ДНК-сорб-С» длителен, требует хороших навыков и имеет высокую стоимость (рис.1).

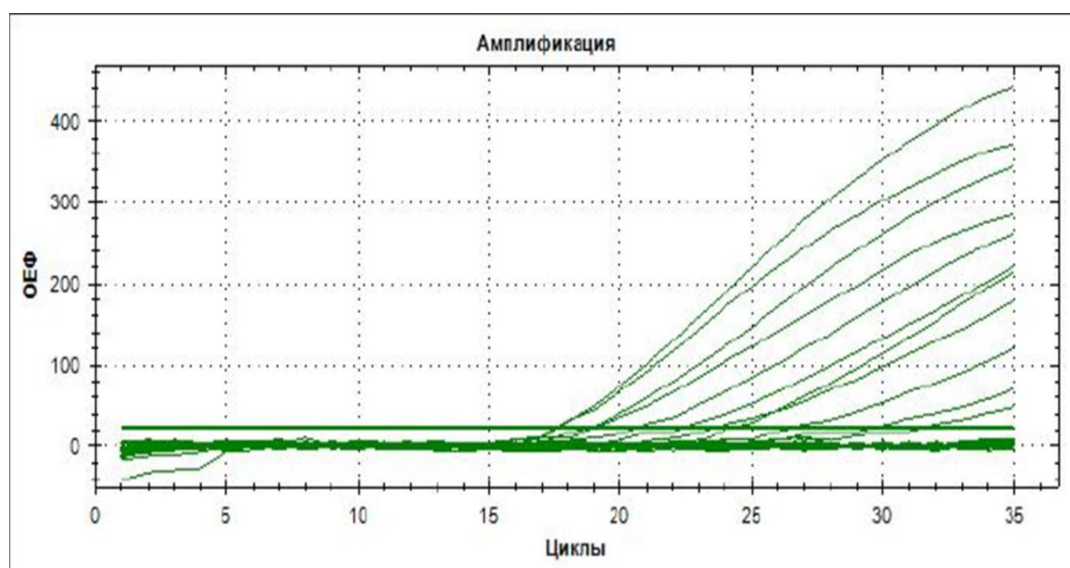


Рисунок 1 – Результаты ПЦР-анализа в режиме реального времени на наличие β -актина в выделенных образцах

Таким образом, до постановки ПЦР с родоспецифичными праймерами была проведена проверка выделенной ДНК в клинических образцах. После подтверждения наличия ДНК в образцах проводили амплификацию методом классической ПЦР.

3.2. Праймеры для амплификации бактерий рода *Campylobacter*

В своем исследовании использовали две пары праймеров для контроля и сравнения результатов. Первой парой, используемой в работе, были праймеры из статьи Батаевой с соавт. (рис. 2, 3).



Рисунок 2 – Фрагмент статьи Батаевой с соавт. (2017)

Таблица 1. 16S rDNA праймеры, использованные для получения фрагментов ДНК бактерий рода *Campylobacter*

Forward primer	TACGGGAGGCAGCAG	Plus	15	2	16	54.37	66.67	3.00	2.00
Reverse primer	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	Minus	20	566	547	54.11	40.00	4.00	0.00
Product length	565								

Рисунок 3 – Прямые и обратные родоспецифичные праймеры для амплификации бактерий *Campylobacter spp.*

В качестве вторых пар праймеров были использованы праймеры CampF/CampR, которые были подобраны ранее в нашей лаборатории (рис. 4,5) (Бижбалова и др., 2018, в печати).

Ранее данные праймеры были также проверены на специфичность и чувствительность, также был сделан вывод, что они пригодны для детекции ДНК бактерий *Campylobacter spp.* в клиническом материале.

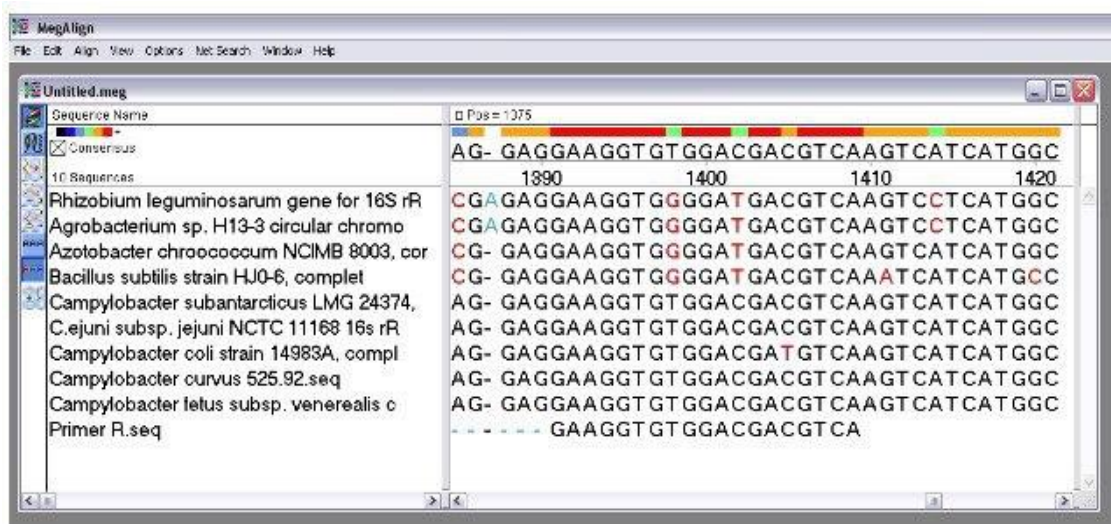


Рисунок 4 – Прямой родоспецифичный праймер для амплификации бактерий *Campylobacter spp.*



Рисунок 5 – Обратный родоспецифичный праймер для амплификации бактерий *Campylobacter spp.*

3.3. ПЦР-анализ с ДНК, выделенной из биоптатов

В результате проведения ПЦР-анализа ДНК исследуемых проб с различными парами праймеров были получены положительные результаты во всех 41 образцах, что свидетельствует о наличии в них искомым бактерий рода *Campylobacter* (рис. 6,7).

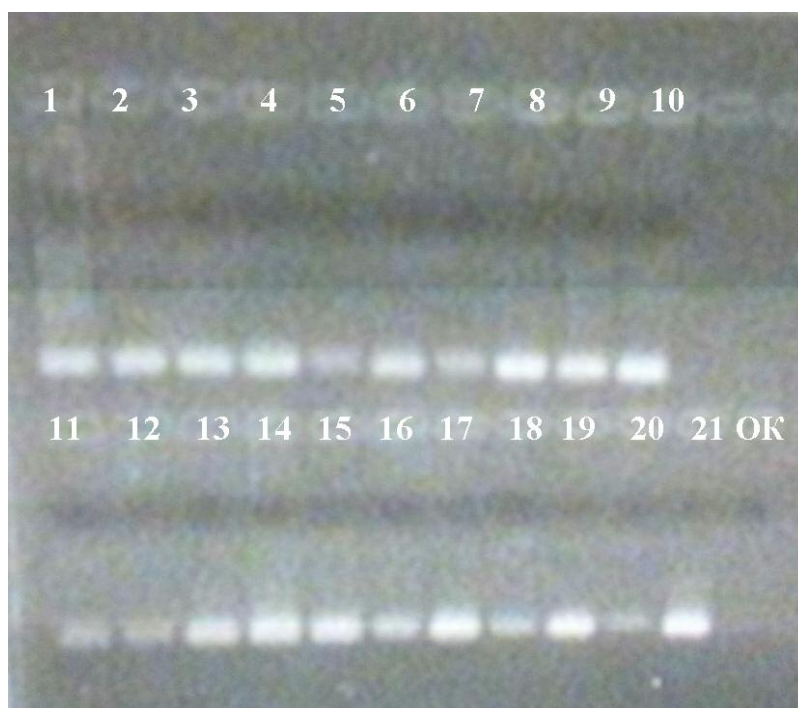


Рисунок 6 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК *Campylobacter spp.* с праймерами из статьи: 1-21 – ДНК, выделенная из биоптатов; ОК - отрицательный контроль

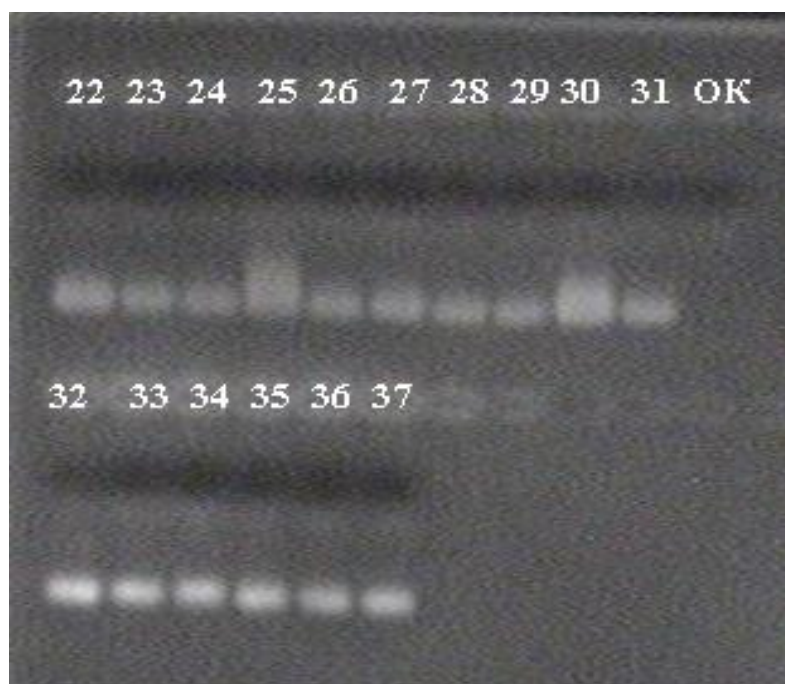


Рисунок 7 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК *Campylobacter spp.* с праймерами CampF/CampR: 22-37 – ДНК, выделенная из биоптатов; ОК - отрицательный контроль

При постановке ПЦР с разными праймерами получили одинаковый результат, что говорит об эффективности обеих пар праймеров.

Кроме того, оптимальным методом выделения ДНК из биоптатов является метод описанный Писаревой с соавт. (2015), где происходит лизис ТПФ в растворе щелочи в присутствии детергента, сама депарафинизация методом вымораживания и осаждение ДНК этанолом, так как в результате получаем высокоочищенную ДНК, свободную от примесей парафина и ингибиторов, мешающих проведению ПЦР анализа.

3.4. ПЦР-анализ с ДНК, выделенной из кала

При исследовании ДНК, выделенной из кала, ни с одной парой праймеров *Campylobacter spp.* обнаружен не был (рис. 8).

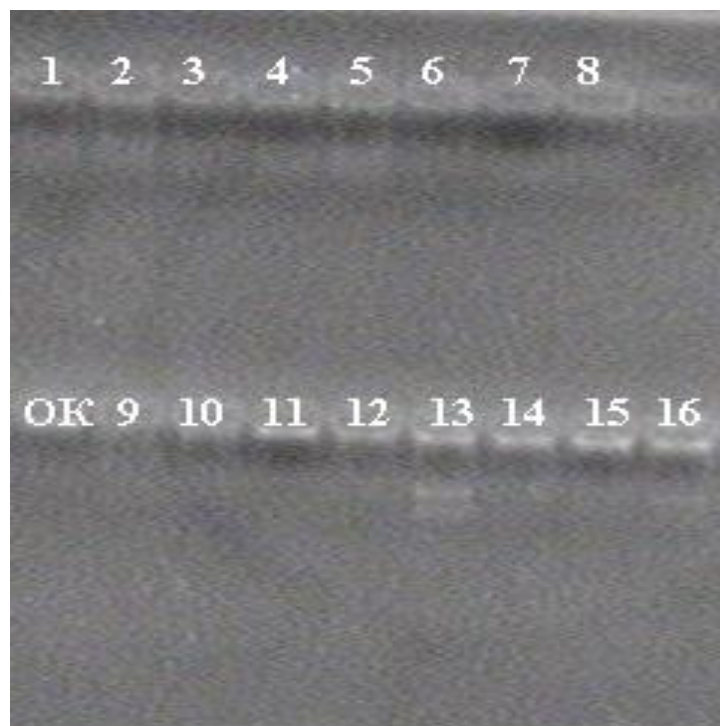


Рисунок 8 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК *Campylobacter spp.* с праймерами из статьи: 1-16 – ДНК, выделенная из кала; ОК - отрицательный контроль

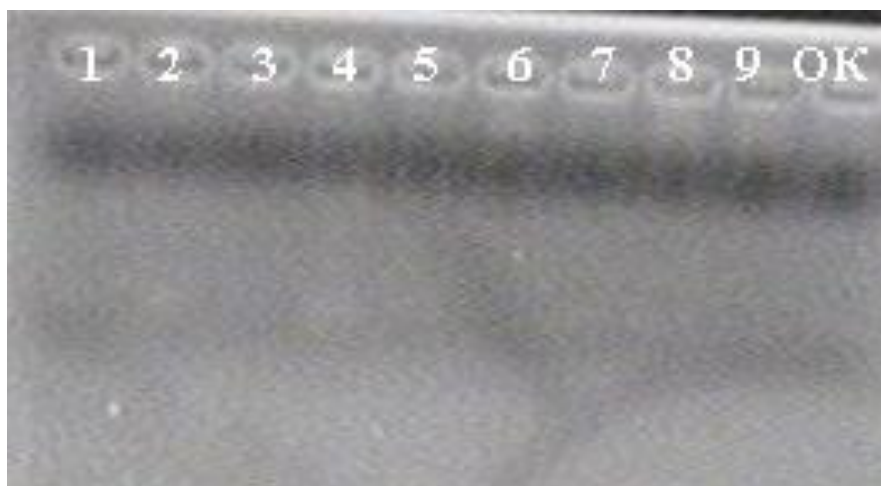


Рисунок 9 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК *Campylobacter spp.* с праймерами CampF/CampR: 1-9 – ДНК, выделенная из кала; ОК - отрицательный контроль

Такой результат может быть связан с тем, что кампилобактерии концентрируются в слизистой оболочке толстого кишечника, обладают высокой адгезивностью и инвазивностью по отношению к энтероцитам и колоноцитам и вследствие этого наибольшая концентрация бактерий находится именно в клетках кишечника, а их концентрация в кале очень низкая.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВЗК является одной из сложнейших проблем гастроэнтерологии из-за тяжести течения, инвалидизации и летальности. Этиологическую роль играют воспаления аутоиммунного характера и различные бактериальные агенты.

Методом ПЦР был проанализирован клинический материал (кал) 54-х пациентов на наличие кампилобактерий и 41 образец биоптатов. При этом в клинических образцах, выделенных из фекалий ДНК бактерий рода *Campylobacter* не были обнаружены. В результате проведения ПЦР с ДНК исследованных проб биоптатов во всех случаях были получены положительные результаты, свидетельствующие о наличии в них искомым бактерий рода *Campylobacter*.

Для выделения ДНК из биоптатов использовали депарафинизацию и оптимизировали метод выделения ДНК из ткани, фиксированной в формалине и заключенной в парафин, который дал результат. Использованный метод был наиболее подходящим для выделения ДНК из биоптатов и имел больше преимуществ: быстрый лизис ткани, отсутствие органических растворителей и в несколько раз ниже стоимость, что позволяет рекомендовать его для широкой клинико-лабораторной практики.

Таким образом, были испытаны две пары праймеров, которые доказали наличие бактерий рода *Campylobacter* в биоптатах при ВЗК в 100% случаях и пригодные для дальнейшего использования на практике для идентификации методом ПЦР.

ВЫВОДЫ

1. Для выделения ДНК из биоптатов может применяться депарафинизация, фиксированных в формалине и заключенных в парафин блоков, для эффективной детекции *Campylobacter spp.* методом ПЦР.
2. Качество выделенной ДНК может быть проверена с праймерами на наличие б-актина (глобулярного белка человека).
3. Классическая ПЦР эффективна в детекции бактерий рода *Campylobacter* с родоспецифичными праймерами, которая обеспечивает обнаружение *Campylobacter spp.*, в том числе в биоптатах.
4. При исследовании ДНК, выделенной из кала, взятой у пациентов с диагнозом «острые кишечные инфекции» не позволяет обнаруживать бактерии рода *Campylobacter*, тогда как исследование биоптатов от пациентов с диагнозом «неспецифический язвенный колит» показало наличие ДНК во всех образцах.
5. Результаты проделанной работы могут быть применены в медицине, в практическом здравоохранении, в лабораторной диагностике для выявления данных микроорганизмов как для этиологической диагностики, так и для контроля эффективности лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адлер Г. Болезнь Крона и язвенный колит / Пер. с нем. М.: ГЕОТАР-Мед., 2001. С. 500.
2. Батаева Д.С., Минаев М.Ю., Юшина Ю.К., Соколова О.В., Зайко Е.В. Концептуальные подходы к экспресс выявлению *Campylobacter spp.* в мясе убойных животных // Theory and practice of meat processing №4, 2017.
3. Белоусова Е.А. Язвенный колит и болезнь Крона. Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2002. С.128.
4. Беседнова Н.Н. Иммунокорректоры // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. - № S3. – С. 111-117.
5. Бехтерева М.К., Ныrkova О.И., Сиземов А.Н. кампилобактериоз // Педиатр. – 2012. – Т.3, №3. – С. 102-109.
6. Бижбалова Л.О., Хакимова Л.Р., Гайнуллина Э.Д., Зигангирова Н.Н., Юмагужина Г.К. Бактерии рода *Campylobacter* и неспецифический язвенный колит // Вестник Башкирского государственного медицинского университета, 2018.
7. Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2006. – 304 с.
8. Воробьев Г.И., Халиф И.Л. Неспецифические воспалительные заболевания кишечника. – М.: Миклош, 2008. – 400 с.
9. Горелов А.В. Кампилобактериоз у детей // Инфекционные болезни. – 2004. – Т.2, №3. – С. 80-82.
10. Джемилев У.М., Толстиков Г.А., Сысолятин С.В. и др.; заявитель и патентообладатель Институт нефтехимии и катализа Российской академии наук. - № 2007135691/04; заявл. 26.09.2007; опубл. 10.06.2009 // Пат. 2357973 Российская Федерация, МПК C07K5/062. Способ получения дипептидов лупанового ряда.

11. Жаркова М.С., Орлов Д.С., Кокряков В.Н., Шамова О.В. Антимикробные пептиды млекопитающих: классификация, биологическая роль, перспективы практического применения (обзорная статья) // вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3: биология. – 2014. - № 1. – С. 98-114.
12. Круглов А.А., Недоспасов С.А. Микробиота, иммунитет кишечника и мышьяная возня. Acta Naturae. Т.6 № 1(20), 2014.
13. Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Богородская С.Л. Микробиота кишечника. Роль в развитии различных патологий. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61(10): 723-726.
14. Кучумова С.Ю., Полуэктова Е.А., Шептулин А.А., Ивашкин В.Т. Физиологическое значение кишечной микрофлоры. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2011; 21(5): 17-27.
15. Лягина И.А., Корнева Т.К., Головенко О.В., Веселов А.В. Характеристика кишечной микрофлоры у больных с язвенным колитом // Российский журнал гепатологии, гастроэнтерологии и колопроктологии. – 2008. - №2. – С. 48-54.
16. Мазанкова Л.Н., Перловская С.Г. Антибиотико-ассоциированная диарея и *Cl. difficile*-инфекция у детей: факторы риска. Детские инфекции, 2015. 14(2). С. 29-34.
17. Нефедов Л.И., Леднева И.О., Каравай А.В., Глазев А.А. и др. Механизмы реализации метаболической и специфической противоопухолевой активности нового препарата деглутам // Лабораторная диагностика Восточная Европа. – 2012. - №1. – С.66-71.
18. Никулина И.В., Златкина А.Р., Белоусова Е.А. и др. Оценка клинико-эпидемиологических показателей воспалительных заболеваний кишечника в Московской области // Российский журнал гепатологии, гастроэнтерологии и колопроктологии. – 1997. - №2. – С. 67-70.

19. Писарева Е. Е., Любченко Л. Н., Коваленко С. П., Шаманин В. А. Оптимизация метода выделения ДНК из ткани, фиксированной в формалине и заключенной в парафин. / Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. - 2015.
20. Румянцев В.Г. Язвенный колит, болезнь Крона // Болезни толстой кишки и аноректальной области. М., 2007. С. 106-132.
21. Соколова Е.Д., Галтаева А.М., Замурий О.Ю., Дидиченко О.В., Соколова Ю.В., Муратова В.А., Лигорова О.Ю., Журавлева И.Н., Макарова М.А., Кафтырева Л.А. // Полимеразная цепная реакция в диагностике острых кишечных инфекций в детском инфекционном стационаре: возможности и проблемы // Инфекция и иммунитет – 2016. – Т.6, №3. – С. 225-231.
22. Татьянанина О.Ф., Потапов А.С., Намазова Л.С., Цимбалова Е.Г., Кучеренко А.Г., Сурков А.Н. // Маркеры кишечного воспаления при заболеваниях кишечника: обзор литературы // Педиатрическая фармакология– 2008. – Т.5, №3. – С. 39-45.
23. Тихомирова О.В., Лачкова Л.В., Кветная А.С. Клинико-патогенетическая характеристика кампилобактериоза у детей // Детские инфекции №3. – 2006. - С.11-15.
24. Халиф И.Л., Лоранская И.Д. Воспалительные заболевания кишечника (неспецифический язвенный колит и болезнь Крона) клиника, диагностика и лечение. – М.:Миклош, 2004. – С.88.
25. Хруцкая М.С., Панкратова Ю.Ю. Воспалительные заболевания кишечника: учеб.-метод. пособие/ М. С.. – Минск : БГМУ, 2013. – С. 59.
26. Шевцов А.Б., Каиржанова А.Д., Абишева Г.Д., Шевцова Е.К., Камалова Д.К., Джаилбекова А.С., Карибаев Т.Б., Сытник И.И., Ахметова А.Е., Муканов К.К. // Разработка ПЦР-теста для видовой идентификации *C. coli*, *C. jejuni*, *C. fetus* // Eurasian Journal of Applied Biotechnology №3. – 2014.

27. Шуляк Б.Ф. Диагностика кампилобактериозов // РВЖ СХЖ. – 2008. - №4. – 19-21.
28. Aagaard K., Ma J., Antony K.M., Petrosino J., Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.* 2014; 6(237): 237ra65.
29. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473(7346): 174 – 80.
30. Bergstrom A., Skov T.H., Bahl M.L., Roager H.M., Christensen L.B., Ejlerskov K.T. et al. Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal explorative study of a large cohort of Danish infants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(9): 2889 - 900.
31. Bernstein C., Eliakim A., Fedail S. et al. WGO Global Guidelines IBD. World Gastroenterology Organization, 2015. P. 42.
32. Budding A.E., Grasman M.E., Lin F., Bogaards J.A., Soeltan-Kaersenhout D.J., Vanderbroucke-Grauls C.M. et al. IS-pro: high-throughput molecular fingerprinting of the intestinal microbiota. *FASEB J.* 2010; 24(11): 4556-64.
33. Codling C., O'Mahony L., Shanahan F. et al. A molecular analysis of fecal and mucosal bacterial communities in irritable bowel syndrome. *Dig. Dis. Sci.*, 2010, 55, 392-397.
34. Denno D.M. et al. Etiology of diarrhea in pediatric outpatient settings // *Pediatr Infect Dis J.* – 2005. – Vol. 24(2). – P. 142-148.
35. Eckburg P., Bik E., Bernstein C. et al. // Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 2005, 308, 1635-1638.
36. Endo K., Shiga H., Kinouchi Y., Shimosegawa T. Inflammatory bowel disease: IBD // *Rinsho Byori* / - 2009. – Vol. 57. – P.527-532
37. Fagerhol V.K., Andersson K.B., Naess-Andresen C.F. et al. Calprotectin (the L1 leukocyte protein) / In: Smith V.L., Dedman J.R., eds. *Stimulus Response Coupling: The Role of Intracellular Calciumbinding Proteins.* – Boston, Boca Raton: CRC Press; 1990. – P. 187-210/

38. Farrell R.J. Microbial factors in inflammatory bowel disease // *Gastroenterol. Clin. North. Am.* – 2002. – Vol. 31, № 1. – P.41-62.
39. Flint J.A. et al. Estimating the Burden of Acute Gastroenteritis, Foodborne Disease and Pathogens Commonly Transmitted by Food: An International Review // *Clinical Infectious Diseases.* – 2005. – Vol. 41. – P. 698-704.
40. Goossens H., Giesendorf B.A., Vandamme P. et al. *J Inf Dis*, 1995, 172, 1298-1305.
41. Hindiyyeh M., Jense S., Hohmann S. et al. *J Clin Micr*, 2000, 38, 3076-3079.
42. Janvier B., Ayraud S., Beby-Defaux A. et al. *FEMS Imm Med Micr*, 2000, 27, 3, 263-268.
43. Kashtanova D.A., Tkacheva O.N., Boytsov S.A. Intestinal microbiota and the factors of cardiovascular risk. Part 2. Intestinal microbiota and obesity. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2015; 14(5): 83 – 6. (in Russian).
44. Lugering N., Stoll R., Kucharzik T. et al. Immunohistochemical distribution and serum levels of the Ca(2+)-binding proteins MRP8, MRP14 and their heterodimeric form MRP8/14 in Crohn's disease // *Digestion.* – 1995. - № 56. – P. 406-414.
45. Nachamkin I. In: Murray P.R. et al (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 6th Ed. ASM Press, Washington D. C., 1995, 483-489.
46. Ng SC. Emerging leadership lecture: Inflammatory bowel disease in Asia: emergence of a “Western” disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2015; 30:440–5.
47. Roseth A.G., Aadland E. Jahnsen J. et al. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein // *Digestion.* – 1997. - № 58. – P. 176-180.

48. Roseth A.G., Fagerhol M.K., Aadland E. et al. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study // Scand. J. Gastroenterol. – 1992. № 27. – P. 793-798.
49. Roseth A.G., Schmidt P.N., Fagerhol M.K. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease // Scand. J. Gastroenterol. – 1999. - № 34. – P. 50-54.
50. Silina E.A., Usacheva E.V., Pahol'chuk T.M., Pahol'chuk O.P., Ginzburg R.M., Rodko A.S., Matveeva T.B. Sovremennye kliniko terapevticheskie aspekty kampilobakterioza u detej [Modern clinical and therapeutic aspects of campylobacteriosis in children]. Sovremennaja pediatrija – Modern pediatric, 2011, № 2, P. 68-70.
51. Sohnle P.G., Hahn B.L., Santhanagopalan V. Inhibition of *Candida albicans* growth by calprotectin in the absence of direct contact with the organisms // J. Infect. Dis. – 1996. - № 174. – P. 1369-1372.
52. Sood A., Amre D., Midha V., Sharma S., Sood N., Thara A. et al. Low hygiene and exposure to infections may be associated with increased risk for ulcerative colitis in a North Indian population. Ann Gastroenterol 2014; 27:219–23.
53. Swidsinski A., Ladnoff A., Pernthaler A., et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease // Gastroenterology. – 2002. – Vol. 122. – P. 44-54.
54. Zwolinska-Wsislo M., Brozovski T., Budak A. Effect of *Candida* colonization on human ulcerative colitis and healing on inflammatory changes of the colon in experimental model of colitis ulcerosa // J. Physiol. and Pharmac. – 2009. – Vol. 60, № 1. – P. 107-119.

ПРИЛОЖЕНИЕ



АНТИПЛАГИАТ
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

Башкирский государственный
медицинский университет

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Гайнуллина Эльвина Дамировна
Факультет, кафедра, номер группы	Б-401А
Тип работы	Дипломная работа
Название работы	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ РОДОСПЕЦИФИЧНЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК <i>CAMPYLOBACTER SPP.</i> В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА
Название файла	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ РОДОСПЕЦИФИЧНЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК <i>CAMPYLOBACTER SPP.</i> В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ
Процент заимствования	11,51%
Процент цитирования	1,25%
Процент оригинальности	87,24%
Дата проверки	10:59:42 25 июня 2018г.
Модули поиска	Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС; Модуль выделения библиографических записей; Модуль поиска "БГМУ"
Работу проверил	Кобзева Наталья Рудольфовна ФИО проверяющего
Дата подписи	25.06.2018г. Подпись проверяющего

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

Чтобы убедиться в подлинности справки, используйте QR-код, который содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.

ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Гайнуллина Эльвина Дамировна выполнила выпускную квалификационную работу на тему «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ РОДОСПЕЦИФИЧНЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК *CAMPYLOBACTER SPP.* В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА».

Представленная работа посвящена проблеме ранней диагностики воспалительных заболеваний кишечника, вызываемых бактериями рода *Campylobacter spp.* В связи с этим целью данной ВКР является разработка тест-системы для выявления *Campylobacter spp.* в клиническом материале у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника и оценка ее эффективности.

За время обучения в БГМУ Гайнуллина Э.Д. освоила учебную программу в полном объеме. Все годы училась только на «хорошо» и «отлично», совмещая учебу с научной работой в студенческом научном кружке. Является старостой группы.

В процессе выполнения ВКР Гайнуллина Э.Д. овладела навыками работы с микроорганизмами, включая условно-патогенные бактерии. Освоила методы конструирования диагностических тест-систем для ПЦР, а также методики постановки ПЦР с электрофоретической детекцией и в режиме реального времени. Полученные в ходе выполнения результаты были апробированы и представлены в публикациях и в виде устных сообщений на конференциях, включая международные (БГМУ-2018 и др.).

В ходе выполнения ВКР Гайнуллина Э.Д. продемонстрировала навыки самостоятельной работы и компетенции, которыми должен обладать обучающийся по окончании учебы по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (профиль – микробиология).

Таким образом, выпускная квалификационная работа Гайнуллиной ДОПУСКАЕТСЯ К ЗАЩИТЕ и рекомендуется для положительной оценки.

Научный руководитель:
д.м.н., профессор, зав.кафедрой
фундаментальной и прикладной
микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России



А.Р.Мавзютов

ОТЗЫВ

внешнего рецензента доктора биологических наук Гималова Ф.Р. на выпускную квалификационную работу Гайнуллиной Эльвины Дамировны «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ РОДОСПЕЦИФИЧНЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК *CAMPYLOBACTER SPP.* В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА».

Бактерии рода *Campylobacter* представляют серьёзную проблему медицины и здравоохранения в целом, поскольку показано их этиологическое значение при целом ряде как кишечных, так и внекишечных заболеваний. Однако своевременная лабораторная диагностика существенно осложняется проблемой культивирования этих инвазивных и продуцирующих цитотоксины бактерий и тем, что медицинское значение могут иметь свыше 3 десятков видов этих микроорганизмов.

В этой связи автором была поставлена научная задача молекулярно-генетической родоспецифичной детекции *Campylobacter spp.*, в том числе в биоптатах ткани кишки при воспалительных заболеваниях, что является абсолютно новым.

В ходе проведения данного исследования автором были освоены все необходимые для решения этой задачи методы, включая ряд достаточно редких, ориентированных на исследования биоптатов.

Структурно в работе представлены разделы введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, собственные данные и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, приложения. Сформулированные в работе выводы достаточно обоснованы и могут быть использованы в практической деятельности.

Таким образом, выпускная квалификационная работа Гайнуллиной Эльвины Дамировны «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ РОДОСПЕЦИФИЧНЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК *CAMPYLOBACTER SPP.* В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА», выполненная под руководством зав. кафедрой ФПМ, доктора медицинских наук, профессора Мавзютова Айрата Радиковича является завершённой и соответствует требованиям ФГОС ВО (приказ Минобрнауки РФ №944 от 07.08.2014 г.) по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (бакалавриат), а соискатель заслуживает оценки «отлично».

Доктор биологических наук,
Ученый секретарь
Института биохимии и генетики
УФИЦ РАН

Фуат Рамазанович Гималов





**Альянс клинических химиотерапевтов
и микробиологов**

НП «Развитие партнерства в здравоохранении»

СЕРТИФИКАТ

Настоящим подтверждается, что

Татьяна Яковна Давыдова

принимал участие

в Образовательной конференции
«Рациональное применение антимикробных средств
в амбулаторной практике»

количество прослушанных часов: 5

« 12 » апреля 20 16 г.

Президент Альянса клинических
химиотерапевтов и микробиологов
Профессор

С. В. Яковлев
С. В. Яковлев



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

СЕРТИФИКАТ

УЧАСТНИКА (ЦЫ)

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ

Самушиной Лилия Дмитриевна
д.м.н., профессор Л.Р. Самарова

83-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых

с международным участием

«Вопросы теоретической и практической медицины»

г. Уфа, 23 апреля 2018 г.

Ректор БГМУ



В.Н.Павлов



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

А.А. Златиридова, Т.А. Амигулина, Л.Д. Салимшина, М.О. Булдакова,

В НОМИНАЦИИ *М.Р. Хакимова*

Новые исследования в области лечения рака

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ *А.Р. Мазутов*

83-Й ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

СТУДЕНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

«ВОПРОСЫ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ПРАКТИЧЕСКОЙ

МЕДИЦИНЫ»

г. Уфа, 23 апреля 2018 г.

Ректор БГМУ

В.Н.Павлов



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

*Бужбалиева Л.О., Хакимова Л.Р., Тайпилина Э.Д., Зигангирова Н.Н.,
Юсуповичева Э.К.*
ЗА ЛУЧШИЙ УСТНЫЙ ДОКЛАД СРЕДИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

НА СЕКЦИИ

«Биология, микробиология, физика»

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ *д.м.н., профессор Л.Р. Мавзютов*

83-Й ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

СТУДЕНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

«ВОПРОСЫ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ПРАКТИЧЕСКОЙ

МЕДИЦИНЫ»

г. Уфа, 23 апреля 2018 г.

Ректор БГМУ

В.Н.Павлов

Сертификат

Гайнуллина Эльвина Дамировна

принял(а) участие в работе школы-семинара

HTSDD-2018
High throughput screening in drug discovery

состоявшейся 13 июня 2018 г. в городе Уфа
в рамках Государственного контракта РФ "Новый рациональный
подход к разработке антибактериальных и противоопухолевых
лекарственных молекул с применением технологии ВПС"

Председатель программного комитета
к.б.н. Иваненков Ян Андреевич





Вестник Башкирского государственного медицинского университета

сетевое издание

ISSN 2309-7183



№4 (приложение), 2016

vestnikbgmu.ru



**Сборник материалов
81-й Всероссийской итоговой молодежной научной конференции
с международным участием
«Вопросы теоретической и практической медицины»,
Уфа, 18-20 апреля 2016 г.
(приложение)**

УДК: 599.36/.38

Э.Д. Гайнуллина, К.О. Перышкина, А.Т. Волкова

МЕЛКИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИЕ ОКРЕСНОСТЕЙ Г.УФЫ

Кафедра биологии, Башкирский государственный медицинский университет, г.

Уфа

Резюме: Описан видовой состав фауны мелких млекопитающих в окрестностях г. Уфы. Сбор материала проведен в период учебной полевой зоологической практики в июне 2015 г. Определены показатели относительной численности и индексы доминирования видов в различных биотопах.

Ключевые слова: мелкие млекопитающие, видовой состав, относительная численность, индекс доминирования.

E.D. Gaynullina, K.O. Peryshkina, A.T. Volkova

SMALL MAMMALS SURROUNDINGS UFA

Biology department, Bashkir state medical university, Ufa

Abstract: It is described species composition of fauna of small mammals in the vicinity of Ufa. Collection of material was hold during the training field zoological practices in June 2015. It was defined indices of relative population and indices dominance of species at different biotopes.

Key words: small mammals, specific composition, relative quantity, prevailing index.

Актуальность: Мелкие млекопитающие – представители отрядов Грызуны (Rodentia Bowdich, 1821) и Насекомоядные (Insectivora Bowdich, 1821) – одна из самых многочисленных, широко распространённых, значимых в естественных и искусственных ландшафтах группа животных. Функционирование природных экосистем в значительной мере обусловлено видовым разнообразием, структурой образующих их сообществ, в связи с чем организация межвидовых группировок, лежащая в их основе, привлекает пристальное внимание учёных и актуальность исследований их жизнедеятельности неоспорима [7].

Мелкие грызуны — важнейшие потребители зелёной массы растений, их семян и насекомых, составляют важную группу консументов — потребителей органического вещества в экосистемах. Широко известна роль этих млекопитающих как участников паразитарных систем, переносчиков болезней, объектов питания хищных видов животных, а также как «вредителей» сельскохозяйственных и лесных культур [3].

Млекопитающие служат удобным модельным объектом для исследований в качестве элемента живой природы высокого уровня развития. Они участвуют в таких важных

экосистемных процессах, как перенос вещества и энергии, структурообразование, создание биопродукции, и занимают разные трофические уровни в экологических пирамидах. Изучение сообществ мелких млекопитающих вносит важный вклад в исследования структуры и функционирования сообществ на локальном, региональном и глобальном уровнях [5].

Антропогенное влияние на природные комплексы по своей продолжительности и интенсивности неоднозначно. В условиях трансформированного ландшафта в лесных насаждениях, изменённых рубками, формируется специфическая среда обитания для сообществ мелких млекопитающих. Изменяется состав и структура сообществ, населяющих защитные лесные полосы [6].

Цель исследования: изучение видового состава мелких млекопитающих в различных биотопах окрестностей г. Уфы.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Сбор животных из ловушек Барбера-Гейлера.
2. Камеральная обработка отловленных мелких млекопитающих.
3. Препарирование черепов и их очищение.
4. Определение видов (по внешним морфологическим и краниологическим признакам).
5. Определение примерного возраста животных.
6. Изучение биотопической приуроченности разных видов мелких млекопитающих.
7. Сравнение данных по микромаммам за 2014 и 2015 годы.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили мелкие млекопитающие, отловленные попутно с напочвенными насекомыми в окрестностях г. Уфы (июль 2014г., июнь 2015 г.). Учетные площадки были заложены в 4 биотопах: березово-дубовый лес, дубово-лещиновый лес, кленово-березовый лес, лещиновый лес. Для сбора мелких млекопитающих использовали ловушки Барбера - Гейлера с фиксирующим раствором (4% формалин). Данные ловушки рассчитаны на случайное попадание в них передвигающихся насекомых и мелких млекопитающих. Ловушки устанавливались в линию через 10 метров по равнобедренному треугольнику [8].

Верхний край ловчих ёмкостей находился на уровне почвы и не выступал над ним. Внутренние края ловчих ёмкостей были гладкими, чтобы попавшие внутрь насекомые и мелкие млекопитающие не смогли выбраться наружу. Забор мелких млекопитающих провели через 9 дней. Добытых зверьков подвергали стандартному зоологическому обследованию: определяли вид, пол, возраст, репродуктивный статус,

фиксировали экстерьерные и интерьерные показатели [1, 2, 4]. Относительную численность видов вычисляли соотношением количества видов к ловушко-суткам, а также индекс доминирования вида по отношению к другим видам мелких млекопитающих в %.

Результаты исследования и их обсуждение. Данные по фаунистическим спискам, относительной численности и индексу доминирования видов по годам исследований приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Относительная численность и индекс доминирования мелких млекопитающих различных биотопов окрестностей г. Уфы за 2015 год

Вид	Биотоп			
	Березово-дубовый лес	Дубово-лещиновый лес	Кленово-березовый лес	Лещиновый лес
Полевка рыжая (Clethrionomys glareolus, Schreber)	-	0,07; 50	0,04; 100	-
Обыкновенная бурозубка (Sorex araneus L.)	0,04; 100	0,07; 50	-	0,04; 100

Таблица 2

Относительная численность и индекс доминирования мелких млекопитающих различных биотопов окрестностей г. Уфы за 2014 год

Вид	Биотоп			
	Луг злаково-разнотравный	Дубово-липовый	Липняк дубово-рябиновый	Урема ивово-кленовая
Полевка рыжая (Clethrionomys glareolus, Schreber)	0,03; 100	0,03; 20	-	0,03; 100
Мышь полевая (Apodemus agrarius Pallas)	-	0,06; 40	-	-
Обыкновенная бурозубка (Sorex araneus L.)	-	0,06; 40	-	-

Средняя бурозубка (<i>Sorex caecutiens</i> , Laxmann)	-	-	0,03; 100	-
--	---	---	-----------	---

В 2014 году было отловлено 8 экземпляров мелких млекопитающих на 457 ловушко-суток. В дубово-липовом лесу обнаружили мышь полевую (*Apodemus agrarius*) ($n_{\text{относ}}=0,06$; ИД 40%), обыкновенную бурозубку (*Sorex araneus*) ($n_{\text{относ}}=0,06$; ИД 40%), рыжую полёвку (*Clethrionomys glareolus*) ($n_{\text{относ}}=0,03$; ИД 20%). В биотопах злаково-разнотравный луг и урема ивово-кленовая выявлена полёвка рыжая (*Clethrionomys glareolus*) ($n_{\text{относ}}=0,03$; ИД 100%), а в липняке дубово-рябиновом - средняя бурозубка (*Sorex caecutiens*) ($n_{\text{относ}}=0,03$; ИД 100%).

В результате анализа фауны мелких млекопитающих за 2014 год в 4 биотопах окрестностей г. Уфы было собрано 7 экземпляров мелких млекопитающих на 108 ловушко-суток. В дубово-лещиновом лесу обнаружили обыкновенную бурозубку (*Sorex araneus*) ($n_{\text{относ}}=0,07$; ИД 50%), рыжую полёвку (*Clethrionomys glareolus*) ($n_{\text{относ}}=0,07$; ИД 50%). В биотопах березово-дубовый и лещиновый леса в ловушки пойманы обыкновенная бурозубка (*Sorex araneus*) ($n_{\text{относ}}=0,04$; ИД 100%), а в кленово-березовом лесу – рыжая полёвка (*Clethrionomys glareolus*) ($n_{\text{относ}}=0,04$; ИД 100%).

Наибольшее количество видов мелких млекопитающих наблюдали в дубняках: в 2015 году два вида, а в 2014 г. три вида.

Заключение. Численность – один из важнейших показателей состояния населения мелких млекопитающих. Суммарное обилие видов, составляющих сообщество, отражает сумму видовых реакций на комплекс внешних воздействий и характер межвидовых взаимодействий внутри сообществ. В лесных сообществах мелкие млекопитающие являются основными прокормителями кровососущих насекомых и клещей, природными резервуарами возбудителей таких опасных заболеваний как геморрагическая лихорадка, весенне-летний энцефалит и другие.

Выводы:

1. За период исследования биотопов окрестностей г. Уфы было выявлено 4 вида мелких млекопитающих, относящихся к 2 отрядам и 3 семействам.
2. Преобладание видов в 2014 году обусловлено большим количеством отработанных ловушко-суток и отловом в разнообразных местообитаниях.
3. Относительная численность микромаммалей в 2014 году составила 0,02, а в 2015 году – 0,06, что показывает рост численности в популяциях мелких млекопитающих.
4. Наибольшее количество видов встречено в дубняках.

Литература

1. Большаков В.Н. Млекопитающие Свердловской области: справочник-определитель Екатеринбург: Изд-во «Екатеринбург», 2000. 240 с.
2. Виноградов Б. С., Громов И. М. Краткий определитель грызунов фауны СССР. Л.: Наука, 1984-140 с.
3. Кислый А. А., Одинцева А. А., Одинцев О. А. Мелкие млекопитающие окрестностей города Тобольска // Омский научный вестник №1 (138) 2015 г. С. 157-160.
4. Клевезаль Г.А. Принципы и методы определения возраста млекопитающих. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. 283 с.
5. Сергеев В.Е. Эколого-эволюционные факторы организации сообществ бурозубок (Insectivora, Soricidae, Sorex) Северной Азии: Автореф. дисс. д-ра биол. наук / Новосибирск, 2003. 33 с.
6. Соколов Г.А. Охрана и рациональное использование природных ресурсов: учебное пособие / Красноярск, 2000. 96 с.
7. Шварц С.С. Общие закономерности, определяющие роль животных в биогеоценозах // Журнал общей биологии, 1967. – Т.28. - №5.
8. Barber H. S. Traps for Inhabiting // Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society. 1931. Vol. 46. P. 259-266/



Вестник Башкирского государственного медицинского университета

сетевое издание

ISSN 2309-7183



приложение №3, 2018

vestnikbgmu.ru

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

Часть 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА СЫРЬЯ ХРИЗАНТЕМ 1046

Ш. Ж. Торобеков

РЕАКЦИИ ИДЕНТИФИКАЦИИ 3-ЦИКЛОГЕКСИЛАМИНОМЕТИЛТИАЗОЛО[3,2-а]

БЕНЗИМИДАЗОЛА 1052

Педиатрия

А.И. Миннигулова

ЭКЗОКРИННАЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО
ТИПА У ДЕТЕЙ: НОВАЯ ПРОБЛЕМА ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИИ 1057

Э. Н. Хасанова, Р. Р. Бадретдинова

ХАРАКТЕРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ И БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ
..... 1062

С.С. Жуков, Д.В. Бородачук

СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАННЕГО ПРИМЕНЕНИЯ ЭТАНЕРЦЕПТА
ПРИ ЮВЕНИЛЬНОМ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ 1066

А. С. Сергеева, Л. И. Величко, В. А. Сорокин, С. Д. Павлова, М. М. Низамов

ОЦЕНКА И АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВЕСА И РОСТА ДЕТЕЙ ПОДРОСТКОВОГО ВОЗРАСТА В
ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛА ЗА 2016 ГОД ПО ДАННЫМ ЦЕНТРА ЗДОРОВЬЯ ГБУЗ РБ «ДЕТСКАЯ
ПОЛИКЛИНИКА №5» Г.УФА 1072

Р.Р. Галимуллина

ОЦЕНКА ФИЗИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ ПУТЕМ ЭКСТАРКОПОРАЛЬНОГО
ОПЛОДОТВОРЕНИЯ..... 1077

А.С. Попов, Д.Р. Жилкина, Д.С. Рословец

ЭКСКРЕЦИЯ КАЛЬЦИЯ С МОЧОЙ У ДЕТЕЙ НА ГРУДНОМ И ИСКУССТВЕННОМ
ВСКАРМЛИВАНИИ..... 1082

Р. Р.Бадретдинова, Э. Н. Хасанова

ОСОБЕННОСТИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ 1087

Биология, микробиология, физика

Валова Я.В.^{1,2}, Каримов Д.О.¹, Кутлина Т.Г.¹, Мухаммадиева Г.Ф.¹, Хуснутдинова Н.Ю.¹

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *GCLC* ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ У
КРЫС..... 1092

^{1,2}А.Р. Габдрахманова, ¹Р.Ш. Сафин, ¹В.С. Щекин

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ОЧИЩЕННЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИИ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA В ЭКСПЕРИМЕНТЕ..... 1097

Каримов Д.О.¹, Кутлина Т.Г.¹, Валова Я.В.^{1,2}, Мухаммадиева Г.Ф.¹, Хуснутдинова Н.Ю.¹

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНА <i>GSTP</i> ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ У КРЫС.....	1102
М.В. Курилов, Д.О. Каримов, Н.Ю. Хуснутдинова, Р.А. Даукаев	
МЕТАБОЛИЗМ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ КОНСЕРВАНТОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА.....	1107
Кутлина Т.Г. ¹ , Валова Я.В. ^{1,2} , Каримов Д.О. ¹ , Мухаммадиева Г.Ф. ¹ , Хуснутдинова Н.Ю. ¹	
ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА <i>GSTT</i> ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ У КРЫС.....	1112
А. Р. Муллабаева	
СТРЕПТОКОККИ КАК ПАТОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКТОР РАЗВИТИЯ ОЧАГОВОЙ ДЕМИНЕРАЛИЗАЦИЕЙ ТВЕРДЫХ ТКАНЕЙ ЗУБОВ.....	1117
Э.Н. Усманова, А.С. Фазлыева, Д.О. Каримов, Р.А. Даукаев, Д.А. Смолянкин	
НАКОПЛЕНИЕ КАДМИЯ В ОРГАНАХ КРЫС ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ	1122
А.С. Фазлыева, Э.Н. Усманова, Д.О. Каримов, Р.А. Даукаев, Д.А. Смолянкин	
НАКОПЛЕНИЕ КАДМИЯ В ОРГАНАХ КРЫС ПРИ СУБХРОНИЧЕСКОМ ОТРАВЛЕНИИ.....	1127
И.А. Янгурина, К.А. Сазонова, Е.Ш. Зулъкарнаева	
СРАВНЕНИЕ ИНФОРМАТИВНОСТИ МЕТОДОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	1132
Э.Ф. Бердигулова	
К ВОПРОСУ О РОЛИ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ И СРЕДЫ В ПРОЯВЛЕНИИ НАРКОЛЕПСИИ	1137
К.Ю. Швеца ¹ , А.Р. Бахтияева ¹ , А.Т. Загафуранова ¹ , А.Д. Дворенкова ¹ , Е.В. Третьякова ²	
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ	1142
Е. Ш. Зулъкарнаева, К. А. Фархутдинова, И. А. Янгурина	
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНЫХ, СПИРТОВЫХ И ГЕКСАНОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ВОДЯНОГО ОРЕХА <i>TRAPASIBIRICA</i> И ДРУГИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ	1147
Н.Н. Зигангирова, Г.К. Юмагужина, Э.Д. Гайнуллина, Л.О. Бижбалова, Л.Р. Хакимова	
ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ФРАГМЕНТОВ ГЕНОВ «ОСТРОВОВ» ГЕНОТОКСИЧНОСТИ <i>PKS+ESCHERICHIA COLI</i> ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА	1152
А.А. Трушкова, П.Е. Базарова	
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ В ОБРАЗЦАХ ВОДЫ ОТКРЫТЫХ ВОДОЁМОВ ГОРОДА УФЫ.....	1157
Л.О. Бижбалова, Л.Р. Хакимова, Э.Д. Гайнуллина, Н.Н. Зигангирова, Г.К. Юмагужина	
БАКТЕРИИ РОДА <i>SAMPYLOBACTER</i> И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ЯЗВЕННЫЙ КОЛИТ	1160
Д. Ю. Анпилогова	

УДК 616.345:579.84

Н.Н. Зигангирова, Г.К. Юмагузина, Э.Д. Гайнуллина, Л.О. Бижбалова, Л.Р. Хакимова

**ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ФРАГМЕНТОВ ГЕНОВ «ОСТРОВОВ»
ГЕНОТОКСИЧНОСТИ *PKS+ESCHERICHIA COLI* ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА**

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

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Резюме. *E. coli* несут генетический кластер поликетидсинтазы (*pks*). С ним связывают кодирование мультиферментативного механизма, ответственного за синтез генотоксического вещества, называемого колибактином. Колибактин на фоне воспаления, вызванного *E. coli*, повреждает ДНК энтероцитов и может вызывать клеточное старение или рак. В нашем исследовании фрагмент гена «островка» патогенности *pks* был обнаружен у 13% пациентов с диагнозом дисбактериоз.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, «островки» патогенности, *pks*, дисбактериоз.

N.N. Zigangirova, G.K. YUmaguzhina, E.D. Gaynullina, L.O. Bizhbalova, L.R. KHakimova

**FREQUENCY OF MATCHING OF FRAGMENTS OF THE GENES OF "ISLANDS"
GENOTOXICITY *PKS+ ESCHERICHIA COLI* IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE.**

Scientific Advisor — MD, Full professor A.R. Mavzyutov

Department of Fundamental and Applied Microbiology

Bashkir State Medical University, Ufa

Summary. *E. coli* carry a genetic cluster of polyketide synthase (*pks*). It is associated with the coding of the multienzymatic mechanism responsible for the synthesis of a genotoxic substance called colibactin. Colibactin on the background of inflammation caused by *E. coli*, damages the DNA of enterocytes and can cause cellular aging or cancer. In our study, a fragment of the "island" gene of pathogenicity of *pks* was detected in 13% of patients with a diagnosis of dysbiosis.

Key words: *Escherichia coli*, "islands" of pathogenicity, *pks*, dysbacteriosis

Актуальность. В настоящее время актуальным направлением в исследовании рака толстой кишки является изучение влияний симбиотических микроорганизмов и закономерностей организации этих сообществ [1]. Это связано с тем, что основные представители микробиоты кишечника человека, например, бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, обладая целым арсеналом факторов вирулентности, могут критично изменять жизнедеятельность и клеточный цикл энтероцитов [5-7].

Показано, что патогенный потенциал даже такого классического комменсала, как *Escherichia coli*, может существенно изменяться ввиду исключительной пластичности их генома [8]. Указанное связывают с мутациями и/или наличием у этих бактерий целого ряда мобильных генетических элементов, таких как бактериофаги или плазмиды [4,9,12,13]. Однако безусловными лидерами в плане реализации геномной патогенетически значимой пластичности *E. coli* являются «островки» или «острова патогенности», содержащие от одного до нескольких десятков генов, кодирующих факторы патогенности и обеспечивающих внутривидовую и межвидовую передачу с последующим часто кардинальным изменением вирулентности представителей семейства *Enterobacteriaceae* [2,3].

В этой связи огромный научно-практический интерес представляют данные о том, что некоторые штаммы *E. coli* несут генетический кластер поликетидсинтазы (*pks*). С ним связывают кодирование мультиферментативного механизма, ответственного за синтез генотоксического вещества, называемого колибактином. Колибактин на фоне воспаления, вызванного *E. coli*, повреждает ДНК энтероцитов и может вызывать клеточное старение или рак [10]. Островки генотоксичности являются маркерами того, что *E. coli* является одной из причин развития рака толстой кишки.

Цель исследования. Выявить частоту встречаемости фрагментов генов «островов» патогенности (*pks*) в клиническом материале при воспалительных заболеваниях кишечника неустановленной этиологии.

Материалы и методы. Объектами исследования в данной работе послужили 54 образца кала от пациентов с патологией ЖКТ. Тотальную ДНК выделяли, используя набор для выделения «ДНК-сорб-В». Затем проводили амплификацию участков ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе Терцик МС2 («ДНК-Технология», Россия). Выделенная тотальная ДНК была амплифицирована с помощью известных праймеров, взятых из статьи [10]. Детекцию амплифицированных фрагментов ДНК осуществляли методом агарозного гель-электрофореза и фотографировали на фотодокументационной системе Gel Camera System (UVP, Inc. США).

Результаты и обсуждение. Методом ПЦР были исследованы клинические образцы больных с патологией ЖКТ на наличие «островов» генотоксичности *pks*, кодирующий мультиферментативный механизм, производящий генотоксическое вещество – колибактин.

Фрагменты гена *pks* были обнаружены в 13 % случаев (рис.1).

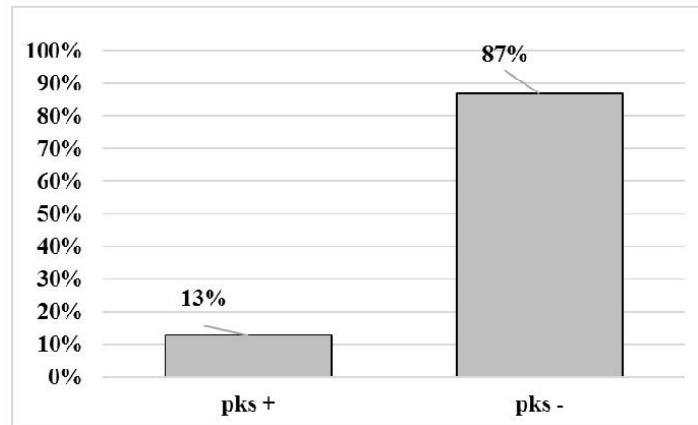


Рис. 1. Частота встречаемости фрагмента *pks* у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника

При этом в исследуемой группе пациентов с патологиями ЖКТ встречались диагнозы дисбактериоз, язвенный колит, острые кишечные инфекции (ОКИ), ВЛ слепой кишки. В результате было выявлено, что фрагмент гена «островка» патогенности *pksE. coli* обнаруживается только в клинических образцах, взятых у пациентов с диагнозом дисбактериоз. Это может говорить о более тяжелом течении заболевания у таких пациентов.

Вывод. Обнаружение фрагмента гена «островка» патогенности *pksE. coli* в клиническом образце не исключает риска развития рака толстой кишки.

Список литературы:

1. Варичев А.Н., Соловьева И.В., Гелашвили Д.Б. Ранговые распределения численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп.// Вестник Нижегородского университета им.Н.И.Лобачевского. – 2012.– Т.2, №3.– С. 34-40.
2. Иванова Е.И., Попкова С.М., Джигоев Ю.П., Долгих В.В., Ракова Е.Б., Бухарова Е.В. Детекция некоторых генов, кодирующих факторы патогенности у типичных изолятов *Escherichiacoli*.// Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2014. – Т.5, №99.- С. 89-94.
3. Мавзютов А.Р., Фиалкина С.В., Бондаренко В.М. “Острова” патогенности условнопатогенных энтеробактерий. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.- 2002.- № 6.- С.5-9.
4. Alfredo G.T., Vazquez-Juarez R.C., Christopher B.T., Garcia-Gallegos J.G. Pathoadaptive mutation that mediates adherence of shiga toxin- producing *Escherichia coli* O111.// *Infection and immunity*.– 2005.– Vol. 73, № 8.– P.4766-4776.
5. Bondarenko V.M., Mavziutov A.R. Types of secretion and regulation of the functional activity of molecules associated with the pathogenicity of *Enterobacteriaceae*.// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.- 2002.- № 5.- С. 86-91.
6. Bondarenko V.M., Mavziutov A.R., Agapova O.V. Serine proteases of gram-negative bacteria: structure, mechanisms of secretion, biological activity.// Журналмикробиологии, эпидемиологииииммунобиологии.- 2002.- № 6.- С. 80-85.
7. Bondarenko V.M., Mavziutov A.R., Gabidullin Z.G. Thermostable enterotoxins of opportunistic pathogenic representatives of *Enterobacteriaceae*.// Журналмикробиологии, эпидемиологииииммунобиологии.- 1998.- № 3.- С.104-107.
8. Bouguenes C.L., Servin A.L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/ Dr adhesins (Afa/ Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens.// *FEMS Microbiology Letters*.– 2006.– Vol. 256, Issue 2.– P.185-194.
9. Croxen M.A., Finlay B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity.// *Nature Reviews Microbiology*.– 2010.– Vol. 8.– P. 26-38.
10. Eaton K., Yang W. Reproducibility Project: Cancer Biology Registered report: Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *eLife*. 2015; 4: e04186. DOI: 10.7554/eLife.04186
11. Holmes B. Bacteria make major evolutionary shift in the lab.// *New Scientist*.- 2008.– P.1192-1205.
12. Ochman H., Lawrence J. G., Groisman E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation.//*Nature*.– 2000.– Vol. 405.– P. 299-304.

13. Sokurenko E.V., Hasty D.L., Dykhuizen D.E. Pathoadaptive mutations: gene loss and variation in bacterial pathogens.// Trends Microbiol.– 1999.– Vol. 7.– P.191-195.

УДК 616.345:579.84

Л.О. Бижбалова, Л.Р. Хакимова, Э.Д. Гайнуллина, Н.Н. Зигангирова, Г.К. Юмагузина
БАКТЕРИИ РОДА *CAMPYLOBACTER* И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ЯЗВЕННЫЙ КОЛИТ

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

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии,

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Резюме. Подобраны родоспецифические праймеры на консервативные последовательности генов 16S рРНК *Campylobacterspp.* Проведена амплификация ДНК, выделенной из образцов пациентов с неспецифическим язвенным колитом. В 100% образцов получены положительные результаты ПЦР, что не исключает этиологического значения *Campylobacterspp.* при неспецифическом язвенном колите.

Ключевые слова: колит, ПЦР, *Campylobacterspp.*

L.O. Bizhbalova, L.R. KHakimova, E.D. Gaynullina, N.N. Zigangirova, G.K. YUmaguzhina
BACTERIA OF THE GENUS *CAMPYLOBACTER* AND NONSPECIFIC ULCERATIVE
COLITIS

Scientific Advisor — MD, Full professor A.R.Mavzyutov

Department of Fundamental and Applied Microbiology

Bashkir State Medical University, Ufa

Summary. Genusspecific primers were selected for conservative sequences of *Campylobacter spp.* 16S rRNA genes. Amplification of DNA isolated from samples of patients with ulcerative colitis was carried out. In 100% of the samples, positive PCR results were obtained, which does not exclude the etiological significance of *Campylobacter spp.* with nonspecific ulcerative colitis.

Keywords: colitis, PCR, *Campylobacter spp.*

Актуальность. Неспецифический язвенный колит (НЯК) является одной из наиболее сложных проблем современной гастроэнтерологии и колопроктологии [3]. В патогенезе заболевания предполагается значение изменений иммунологической реактивности, дисбиотических сдвигов, аллергических реакций, генетических факторов, нервно-психических нарушений. [4].

Высоко вероятной причиной воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) рассматривают микроорганизмы. При ВЗК не исключается значение *Mycobacterium avium*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter concisus*, а также вирусов, например, цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барра и вируса кори. [2]. Микроорганизмы могут инициировать аутоиммунные поражения ткани кишечника [1]. При этом ввиду высокой подвижности, способности к инвазии и к инициированию аутоиммунных реакций основная роль в этиологии ВЗК может принадлежать бактериям рода *Campylobacter* [6], что было показано на родственных им *Helicobacter pylori* [5]. Однако единого мнения среди исследователей на сей счёт нет, поскольку обнаружение *Campylobacterspp.*, например, культуральным методом крайне сложная лабораторная задача.

Цель исследования. Разработка способа молекулярно-генетической детекции бактерий рода *Campylobacterspp.*

Материалы и методы. Материалом для исследования служил 41 образец от пациентов с гистологическим заключением «неспецифический язвенный колит», из которых выделяли ДНК и проводили амплификацию родоспецифичных фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 Touch "Real time" (Bio-Rad, США). Для этого использовались подобранные нами родоспецифические праймеры на консервативные последовательности генов 16S рРНК *Campylobacterspp.*

Результаты и обсуждение. Подобранные праймеры перед использованием были проверены на гомологию к искомым ампликонам. Анализ праймеров осуществляли с помощью программы Primer-BLAST. Показано, что форвард и реверс праймеры обладали 100% сходимостью по отношению к различным видам бактерий рода *Campylobacter*. Для анализа специфичности участок 16S рРНК *Campylobacterspp.* был выровнен на гомологичные участки 16S рРНК бактерий родов *Escherichia*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*. В результате выравнивания было установлено, что праймеры обладают должной специфичностью и не дают ложноположительные результаты.

Для проверки подобранных родоспецифичных праймеров провели амплификацию с выделенной ДНК чистых культур различных видов микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Pseudomonas aeruginosa*. В результате в каждом

образце были получены отрицательные результаты, что свидетельствует о том, что подобранные праймеры не комплементарны участкам ДНК данных бактерий и обладают специфичностью. Полученные результаты амплификации позволяют утверждать, что использование подобранных праймеров исключает ошибку диагностики при дифференциации рода *Campylobacter* от бактерий родов *Escherichia*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*. Далее были исследованы образцы выделенной ДНК от больных с НЯК.

В результате проведения ПЦР в режиме реального времени с ДНК исследованных проб во всех случаях были получены положительные результаты, свидетельствующие о наличии в них искомым бактерий рода *Campylobacter* (рис. 1).

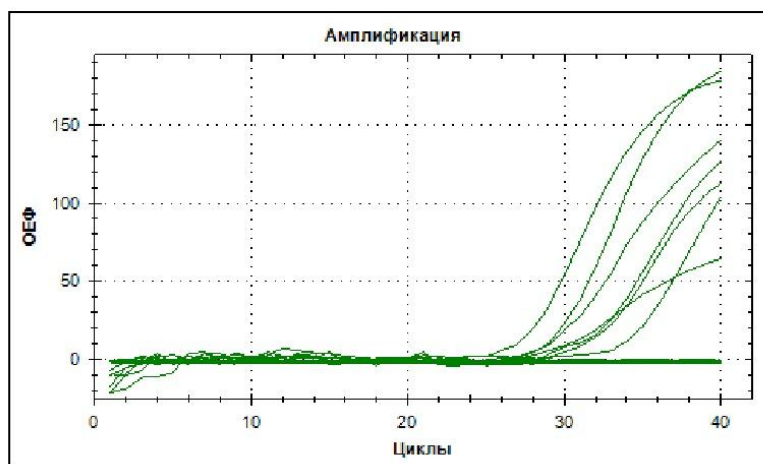


Рис. 1. Результаты амплификации ПЦР в режиме реального времени при выделении ДНК 2 способом

Показанные на рисунке различия в графиках могли быть обусловлены различными концентрациями искомой ДНК.

В целом же полученные результаты могут свидетельствовать о комплементарности подобранных нами олигонуклеотидных праймеров и возможности их дальнейшей оптимизации для разработки соответствующих диагностических систем, применимых для получения новых данных об этиологии неспецифического язвенного колита и других воспалительных заболеваний кишечника.

Литература

1. Полуэктова Е.А., Ляшенко О.С., Королев А.В. Механизмы, обеспечивающие взаимодействие бактериальных клеток с организмом хозяина, и их нарушение у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.// Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.- 2014.- Т.5.- С.42–53.
2. Azimi T., Nasiri M.J., Chirani A.S., Pouriran R., Dabiri H. The role of bacteria in the inflammatory bowel disease development: a narrative review.// APMIS.- 2018.- V.126, N4.- P.275-283.
3. Chen W.X., Ren L.H., Shi R.H. Enteric microbiota leads to new therapeutic strategies for ulcerative colitis.// World J Gastroenterol.- 2014.- V.20, N42.- P. 15657-15663
4. Hold G.L., Smith M., Grange C., Watt E.R., El-Omar E.M., Mukhopadhy I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years?// World J Gastroenterol.- 2014.- V.20, N5.- P.1192-1210
5. Wu X.W., Ji H.Z., Yang M.F., Wu L., Wang F.Y. *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease in Asians: A meta-analysis.// World J Gastroenterol.- 2015.- V.21, N15.- P. 4750-4756
6. Zhang L. Oral *Campylobacter* species: initiators of a subgroup of inflammatory bowel disease?// World J Gastroenterol.- 2015.- V.21, N31.- P.9239-9244

Доклад к защите дипломной работы

1 слайд

Здравствуйте, Уважаемые председатель и члены государственной экзаменационной комиссии.

2 слайд

Воспалительные заболевания кишечника по уровню распространенности и заболеваемости значительно уступают другим заболеваниям внутренних органов. Однако по тяжести течения, частоте осложнений, инвалидизации и летальности они занимают одно из ведущих мест во всем мире в структуре заболеваний органов пищеварения. К ним относятся неспецифический язвенный колит и болезнь Крона.

Хотя точная этиология заболевания до сих пор не ясна, считается, что в его основе лежит воспаление преимущественно аутоиммунного характера, а также активное действие бактериальных агентов. К таким агентам относятся бактерии рода *Campylobacter*, имеющие тропность к тканям слизистой оболочки тонкой и толстой кишки, а также продуцирующие эндо- и экзотоксины.

3 слайд

Кампилобактеры, вызывающие патологию, обладают различными антигенными особенностями, вирулентностью, богатым спектром патогенности.

В настоящее время для диагностики кампилобактериоза используют «золотой стандарт» - выделение и идентификация чистых культур. Внедрение ПЦР-тестов в диагностических лабораториях может упростить и повысить эффективность диагностики кампилобактериозных инфекций.

4 слайд

Цель исследования явилась Разработка тест-системы для выявления *Campylobacter* spp. в клиническом материале у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника и оценка ее эффективности.

Задачи исследования

1. Сбор клинического материала.
2. Выделение ДНК из биоптатов кишечника у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.

3. Выбор родоспецифических праймеров при молекулярно-генетической идентификации.
4. Подбор оптимального метода генетической идентификации.
5. Сравнение результатов молекулярно-генетической детекции ДНК биоптатов с ДНК различных клинических материалов.

5 слайд

В качестве клинического материала использовались биоптаты толстой кишки, полученные при колоноскопии и участки толстой кишки, оперированных по поводу НЯК. Эндоскопические биопсии и операционный материал подвергнуты стандартному гистологическому исследованию после заливки в парафин. Диагноз был установлен на основании общепринятых клинических, эндоскопических, гистологических и рентгенологических критериев.

Также клиническим материалом был кал, собранный у 54-ти пациентов среднетяжелыми формами острой кишечной инфекции. В анамнезе диарея по типу гастроэнтерита. Для постановки диагноза использовались клинические, бактериологические и иммунологические методы.

Методы исследования

1. Высокотемпературная демаскировка;
2. Проверка качества выделенной ДНК с праймерами на наличие b-актина глобулярного белка человека;
3. Выделение бактериальной ДНК из биоптатов и кала;
4. Амплификация участков ДНК методом ПЦР;
5. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле;

6 слайд

Для того, чтобы выявить *Campylobacter spp.* необходимо было произвести демаскировку - высвобождение генетического материала, путем очищения биоптатов от парафина.

Для проверки качества выделенной ДНК после демаскировки был проведен ПЦР в режиме реального времени с праймерами на наличие b-актина (глобулярного белка человека).

В результате выделение ДНК из ткани, фиксированной в формалине и заключенной в парафин, описанная Писаревой с соавт. (2015 оказалась эффективной).

Таким образом, до постановки ПЦР с родоспецифичными праймерами была проведена проверка выделенной ДНК в клинических

образцах. После подтверждения наличия ДНК в образцах проводили амплификацию методом классической ПЦР.

7 слайд

В своем исследовании использовали две пары праймеров для контроля и сравнения результатов. Первой парой, используемой в работе, были праймеры из статьи Батаевой с соавт 2017.

8 слайд

В качестве вторых пар праймеров были использованы праймеры CampF/CampR, которые были подобраны ранее в нашей лаборатории (рис. 4,5) (Бижбалова и др., 2018, в печати).

Данные праймеры были также проверены на специфичность и чувствительность, был сделан вывод, что они пригодны для детекции ДНК бактерий *Campylobacter spp.* в клиническом материале.

9 слайд

В результате проведения ПЦР-анализа ДНК исследуемых проб с различными парами праймеров были получены положительные результаты во всех 41 образцах, что свидетельствует о наличии в них искомым бактерий рода *Campylobacter* (рис. 6,7).

При постановке ПЦР с разными праймерами получили одинаковый результат, что говорит об эффективности обоих пар праймеров.

Слайд 10

При исследовании ДНК, выделенной из кала, ни с одной парой праймеров *Campylobacter spp.* обнаружен не был (рис. 8).

Такой результат может быть связан с тем, что кампилобактерии концентрируются в слизистой оболочке толстого кишечника, обладают высокой адгезивностью и инвазивностью по отношению к энтероцитам и колоноцитам и вследствие этого наибольшая концентрация бактерий находится именно в клетках кишечника, а их концентрация в кале очень низкая.

Слайд 11

Выводы представлены на слайде. Разрешите не зачитывать.

1. Для выделения ДНК из биоптатов может применяться депарафинизация, фиксированных в формалине и заключенных в парафин блоков, для эффективной детекции *Campylobacter spp.* методом ПЦР.

2. Качество выделенной ДНК может быть проверена с праймерами на наличие b-актина (глобулярного белка человека).

3. Классическая ПЦР эффективна в детекции бактерий рода *Campylobacter* с родоспецифичными праймерами, которая обеспечивает обнаружение *Campylobacter spp.*, в том числе в биоптатах.

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

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

Слайд 12

По теме дипломной работы имеются публикации.

Слайд 13,14

Дипломы.

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

Гайнуллина Эльвина Дамировна

**Молекулярно-генетическая детекция
родоспецифичных фрагментов ДНК *Campylobacter spp.*
в биоптатах при воспалительных заболеваниях
кишечника**

Научный руководитель:

д.м.н., проф. Мавзютов А.Р.

Язвенный колит – хроническое заболевание, характеризующееся непрерывным воспалением слизистой оболочки толстого кишечника при отсутствии гранулем в биопсийном материале с поражением прямой кишки и различным по протяженности поражением толстой кишки, имеющее рецидивное и ремиттирующее течение.

Болезнь Крона – гранулематозное воспаление кишки, характеризующееся развитием ее стеноза, образованием свищей и внекишечными проявлениями. Регионарные поражения могут возникать в любых отделах ЖКТ.

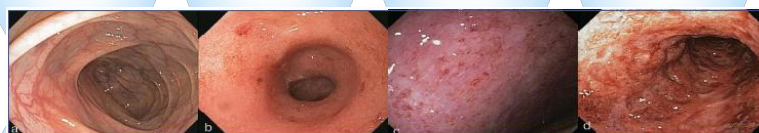


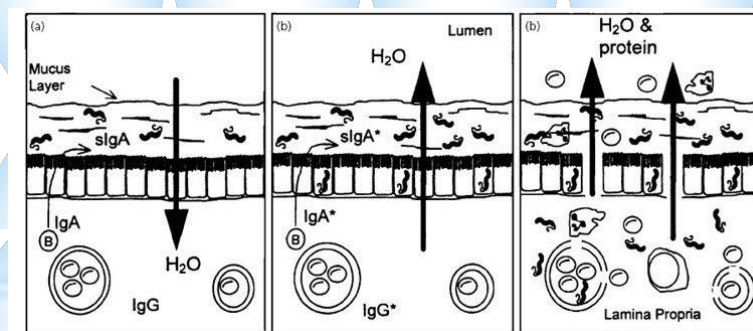
Рисунок 3. Нормальная слизистая толстой кишки (а); НЯК, минимальная (b), умеренная (c) и высокая (d) активность [20]



Рисунок 4. Ключевые эндоскопические признаки болезни Крона: афтозные язвы (а); слизистая в виде «булыжной мостовой» (b); серпингиозные («ползущие») язвы (с); стриктура терминального отдела подвздошной кишки (d) [20]

Campylobacter концентрируются в слизистой оболочке толстого кишечника, так как являются инвазивными бактериями

- плохо окрашиваются
- не растут на обычных питательных средах
- не растут в воздушной среде.



Цель исследования

Разработка тест-системы для выявления *Campylobacter* spp. в клиническом материале у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника и оценка ее эффективности.

Задачи исследования

1. Сбор клинического материала.
2. Выделение ДНК из биоптатов кишечника у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.
3. Выбор родоспецифических праймеров при молекулярно-генетической идентификации.
4. Подбор оптимального метода генетической идентификации.
5. Сравнение результатов молекулярно-генетической детекции ДНК биоптатов с ДНК различных клинических материалов.

Объекты исследования

- Биоптаты слизистой оболочки толстого кишечника пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.
- Кал пациентов среднетяжелыми формами ОКИ.

Методы исследования

- 1.Высокотемпературная демаскировка;
- 2.Проверка качества выделенной ДНК с праймерами на наличие β -актина глобулярного белка человека;
- 3.Выделение бактериальной ДНК из биоптатов и кала;
- 4.Амплификация участков ДНК методом ПЦР;
- 5.Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле;

Выделение ДНК

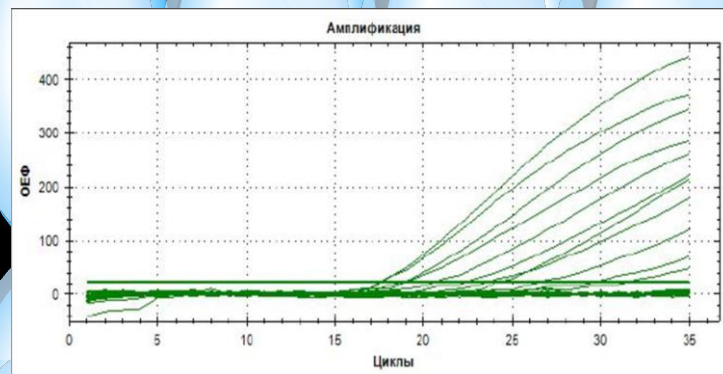


Рисунок 1 – Результаты ПЦР-анализа в режиме реального времени на наличие β -актина в выделенных образцах

Праймеры для амплификации бактерий рода *Campylobacter*

THEORY AND PRACTICE OF MEAT PROCESSING №4 | 2017

УДК/UDC 612.392.81:637.54:579.67

DOI 10.21323/2414-438X-2017-2-4-76-95

ОРИГИНАЛЬНАЯ НАУЧНАЯ СТАТЬЯ КОНЦЕПТУАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПРЕСС-ВЫЯВЛЕНИЮ *CAMPYLOBACTER SPP.* В МЯСЕ УБОЙНЫХ ЖИВОТНЫХ

Батаева Д.С.,* Минаев М.Ю., Юшина Ю.К., Соколова О.В., Зайко Е.В.
 Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

Ключевые слова: бактерии рода *Campylobacter*, говядина, птица, ПЦР

Аннотация

Современный подход формирования качества продуктов питания, основанный на стандартах ИСО серии 9000, указывает на необходимость внедрения систем менеджмента качества на перерабатывающих предприятиях. Согласно анализу баз данных научных публикаций Science Direct (by Scopus) и Web of Science установлено, что исследованию мяса

Рисунок 2 -Фрагмент статьи Батаевой с соавторами (2017)

Таблица 1. 16S rDNA праймеры, использованные для получения фрагментов ДНК бактерий рода *Campylobacter*

Forward primer	TACGGGAGGCAGCAG	Plus	15	2	16	54.37	66.67	3.00	2.00
Reverse primer	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	Minus	20	566	547	54.11	40.00	4.00	0.00
Product length			565						

Рисунок 3 – Прямые и обратные родоспецифичные праймеры для амплификации бактерий *Campylobacter spp.*

Праймеры для амплификации бактерий рода *Campylobacter*

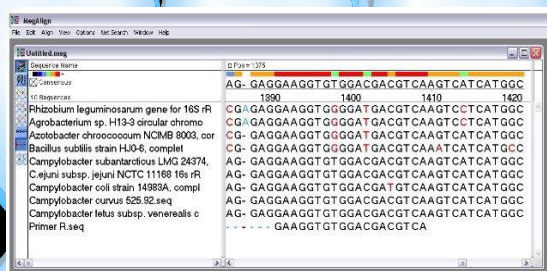


Рисунок 4 – Прямой родоспецифичный праймер для амплификации бактерий *Campylobacter spp.*



Рисунок 5 – Обратный родоспецифичный праймер для амплификации бактерий *Campylobacter spp.*

ПЦР-анализ с ДНК, выделенной из биоптатов

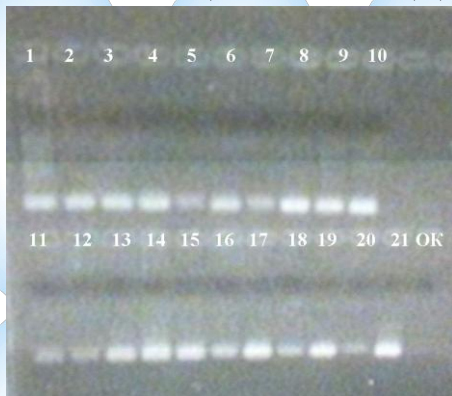


Рисунок 6 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК *Campylobacter* spp. с праймерами из статьи:
1-21 – ДНК, выделенная из биоптатов;
OK – отрицательный контроль



Рисунок 7 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК *Campylobacter* spp. с праймерами CampF/CampR:
22-32 – ДНК, выделенная из биоптатов;
OK – отрицательный контроль

ПЦР-анализ с ДНК, выделенной из кала



Рисунок 8 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК *Campylobacter* spp. с праймерами из статьи:
1-16 – ДНК, выделенная из кала;
OK – отрицательный контроль



Рисунок 9 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК *Campylobacter* spp. с праймерами CampF/CampR:
1-9 – ДНК, выделенная из кала;
OK – отрицательный контроль

Результаты

1. Для выделения ДНК из биоптатов может применяться депарафинизация, фиксированных в формалине и заключенных в парафин блоков, для эффективной детекции *Campylobacter spp.* методом ПЦР.
2. Качество выделенной ДНК может быть проверена с праймерами на наличие b-актина (глобулярного белка человека).
3. Классическая ПЦР эффективна в детекции бактерий рода *Campylobacter* с родоспецифичными праймерами, которая обеспечивает обнаружение *Campylobacter spp.*, в том числе в биоптатах.
4. При исследовании ДНК выделенной из парафина, взятой у пациентов с диагнозом «острый неспецифический язвенный колит» не произошло обнаружения бактерий *Campylobacter*, тогда при исследовании биоптатов от пациентов с диагнозом «неспецифический язвенный колит» показало наличие ДНК во всех образцах.
5. Результаты проделанной работы могут быть применены в медицине, в практическом здравоохранении, в лабораторной диагностике для выявления данных микроорганизмов как для этиологической диагностики, так и для контроля эффективности лечения.

Апробация результатов



1. Бикбалова Л.О., Хакимова Л.Р., Гайнуллина Э.Д., Зигангирова Н.Н., Юмагузина Г.К. Бактерии рода *Campylobacter* и неспецифический язвенный колит / Вестник Башкирского государственного медицинского университета / Сборник материалов 83-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины». - 2018.
2. Зигангирова Н.Н., Юмагузина Г.К., Гайнуллина Э.Д., Бикбалова Л.О., Хакимова Л.Р. Частота встречаемости фрагментов генов «островов» генотоксичности *pkz+* *Escherichia coli* при воспалительных заболеваниях кишечника / Вестник Башкирского государственного медицинского университета / Сборник материалов 83-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины». - 2018.