

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

Султангильдина Миляуша Фаридовна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
МИКРОБИОТЫ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ЧЕЛОВЕКА ПРИ
ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ**

Руководитель:



к.м.н. И.А.Мирсаяпова

Уфа 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень условных обозначений (сокращений)	4
Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	
1.1. Характеристика инфекций дыхательных путей	7
1.2. Род <i>Moraxella</i>	10
1.3. Род <i>Pseudomonas</i>	13
1.4. Род <i>Haemophilus</i>	15
1.5. Род <i>Streptococcus</i>	17
1.6. Род <i>Listeria</i>	21
1.7. Род <i>Klebsiella</i>	23
Глава II. Материалы и методы исследований	
2.1. Объекты исследований	26
2.2. Выделение ДНК	26
2.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	29
2.4. Электрофорез ДНК	31
Глава III. Результаты исследования и их обсуждение	
3.1. Детекция <i>Haemophilus influenzae</i> в клиническом материале методом ПЦР	36
3.2. Детекция <i>Moraxella catarrhalis</i> в клиническом материале методом ПЦР	37
3.3. Детекция <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в клиническом материале методом ПЦР	38
3.4. Детекция <i>Streptococcus pneumoniae</i> в клиническом материале методом ПЦР	39
3.5. Детекция <i>Streptococcus pyogenes</i> в клиническом материале методом ПЦР	40
3.6. Детекция <i>Listeria monocytogenes</i> в клиническом материале	

методом ПЦР-----	41
3.7. Детекция <i>Klebsiella pneumonia</i> в клиническом материале	
методом ПЦР-----	42
3.8. Анализ полученных результатов-----	43
Выводы -----	46
Список литературы -----	47
Приложение -----	52

Перечень условных обозначений (сокращений)

БА - бронхиальная астма

ВКО – внутренний контрольный образец

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВП – внебольничная пневмония

ГВЗ – гнойно-воспалительные заболевания

дНТФ (dNTP) -дезоксирибонуклеозидтрифосфат

ЛПС - липополисахарид

ОКО – отрицательный контрольный образец

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РПГА – реакция прямой гемагглютинации

рРНК – рибосомные рибонуклеиновые кислоты

РСК – реакция связывания комплемента

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

ТАЕ – трис-фцетатный буфер

ТВЕ – трис-боратный буфер

ТРЕ – трис-фосфатный буфер

Введение

Актуальность проблемы. Инфекции дыхательных путей – это острые инфекционные заболевания, возникающие вследствие попадания инфекционных агентов с помощью аэрогенного механизма заражения, поражающими отделы дыхательной системы как первично, так и вторично, сопровождающиеся воспалительными явлениями и характерными клиническими симптомами. Инфекционные заболевания органов дыхания – одна из актуальных проблем современного здравоохранения является наиболее частой причиной обращения за медицинской помощью в РФ и во всем мире.

Спектр этиологически значимых агентов при инфекционных поражениях дыхательных путей чрезвычайно широк. Ведущая роль относится к таким возбудителям, как: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Ligionella pneumophila*, микобактерии, вирусы гриппа типа А и В, респираторные вирусные инфекции, к редким возбудителям относятся *Moraxella catarrhalis* и *Pseudomonas aeruginosa*. Однако, не исключается, что истинная частота встречаемости и видовой состав пневмопатогенов может существенно отличаться от приведенных литературных данных, поскольку для лабораторного их выявления и идентификации используются методы, информативность которых в зависимости от вида бактерий, исследуемого материала, фазы заболевания и т.д., может варьировать в очень широких пределах, что и предопределило цель нашего исследования.

Цель исследования. Оценка частоты встречаемости *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* при различных формах патологии органов дыхательной системы человека молекулярно-генетическим методом.

Задачи исследования:

1. Сбор клинического материала (мокроты) у больных с различными формами легочной патологии.
2. Выделение ДНК из собранного материала
3. ПЦР исследование образцов на наличие ДНК пневматогенов.
4. Статистическая обработка полученных результатов.

Научная новизна: дана оценка частоты встречаемости *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* при различных формах легочной патологии человека, а именно при бронхите, бронхиальной астме, хронической обструктивной болезни легких, внебольничной пневмонии.

Практическая значимость:

Оценка частоты встречаемости дает информацию о распространенности пневмопатогенов, их роли в развитии заболеваний дыхательных путей и их этиологической значимости в развитии осложнений легочных патологий. Полученные данные могут быть использованы при санитарно-эпидемиологическом мониторинге и анализе частоты встречаемости.

Глава I. Обзор литературы.

1.1. Характеристика инфекций дыхательных путей

Инфекции дыхательных путей наиболее распространенных групп заболеваний. Воспаление дыхательных путей имеет, прежде всего, вирусное происхождение, которое на первом этапе «прокладывает путь» бактериальной инфекции. К инфекциям верхних дыхательных путей относится: острый ринит, острый синусит, острый фарингит. При длительном контакте с вирусом, с патогенными бактериями вызывает вторичное бактериальное инфицирование. [3] Основными возбудителями являются 3 микроорганизма: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Moraxella catarrhalis*. А также *Streptococcus pyogenes*. Инфекции дыхательных путей относят к антропонозам. Источником инфекции является больной человек, бактерионоситель. [19]

Наиболее распространенными патологиями дыхательных путей являются: пневмония, бронхит, ХОБЛ бронхиальная астма. [20]

Внебольничные пневмонии составляют большинство пневмоний и относятся к заболеваниям нижних отделов дыхательных путей.

Пневмония – острое инфекционное заболевание, характеризующимся очаговым поражением респираторных отделов легких с обязательным наличием внутри альвеолярной жидкости. [11]

Из многих микроорганизмов лишь некоторые, обладающие повышенной патогенностью, способны при попадании в нижние отделы дыхательных путей вызывать воспалительную реакцию. К таким возбудителям можно отнести пневмококк (*Streptococcus pneumoniae*) – 30-50% случаев заболевания. Пневмококк (*Streptococcus pneumoniae*) – грамположительный инкапсулированный кокк, колонизирующий ротоглотку и вызывающий серьезные заболевания, обычно начинается в правой нижней, средней или левой нижней доле. [14]

Выделяют несколько видов пневмонии: 1) Внебольничная пневмония (приобретенная вне учреждения); 2) нозокомиальная пневмония (приобретенная в лечебном учреждении); 3) аспирационная пневмония; 4) пневмония у лиц с тяжелыми нарушением иммунитета (врожденный иммунодефицит, ВИЧ-инфекция, ятрогенная иммуносупрессия). [15]

Симптомы пневмонии — фебриальная лихорадка, сильный озноб, боли в грудной клетке, повышение температуры тела, головной боль, появляется вялость и быстро утомляемость. [5]

К методам исследования относятся: 1) рентгенография грудной клетки, практически всегда для диагностики ВБП требуется обнаружение изменения в легких в сочетании с подходящей симптоматикой. 2) клинический анализ крови является стандартным диагностическим исследованием. Однако лейкоцитоз указывает на высокую вероятность бактериальной инфекции более $10-12 \times 10^9/\text{л}$, а лейкопения ниже $3 \times 10^9/\text{л}$, обуславливает неблагоприятным прогностическим признаком. 3) Биохимический анализ крови относится к числу стандартных методов, функциональные тесты почки и печени, а также содержания электролитов. 4) микробиологические исследования, проводится посев крови дважды, при наличии кашля — бактериоскопия окрашенного по граму мазка мокроты и ее посев. 5) Бактериоскопия с окраской по грамму. 6) метод полимеразной цепной реакции. [8]

Бронхит — это воспаление бронхов с поражением их слизистой, и проявляющееся преимущественно кашлем (сухим или с отделением мокроты). В основе бронхита лежит поражения слизистой оболочки бронхов. Различают две формы бронхита острый бронхит и хронический бронхит. В основном по всему миру с такими симптомами люди обращаются в больницу. [40].

Среди бактериальных возбудителей бронхита главное положение занимают *H. influenzae*, *S. pneumoniae* и *M. catarrhalis*. Возбудителем заболевания бронхита

являются бактерии или вирусы: микопlasма, стрептококк, гемофильная палочка, риновирус, вирус коксаки и парагриппа. Бронхит вызывает чаще всего таких заболеваний как: дифтерия, брюшной тиф, коклюш. [10]

Хроническая обструктивная болезнь легких — это заболевание, характеризующееся хроническим диффузным воспалением бронхов, продолжительный кашель, одышка, продукция мокроты, усиливающаяся по мере прогрессирования заболевания, в конечной стадии тяжелая дыхательная недостаточность и декомпенсированное легочное сердце. [12]

Перенесенная в детстве тяжелая респираторная инфекция может приводить к понижению функции легких и способствовать риску ХОБЛ в дальнейшем. У больных с ХОБЛ отмечается выживание вирусов в дыхательных путях, часто это (вирусы гриппа, парагриппа, аденовирусы, риносинцитиальные вирусы и др.) [17]

Бактерии (пневмококк, палочка инфлюенции, моракселла) вызывают сенсibilизацию и хронизацию воспаления. [32]

При возрастании заболевания и прикреплении обструктивного синдрома появляется более или менее постоянная одышка, кашель становится менее производительней, приступообразным, надсадным. [41]. Главная жалоба касательно на ранних этапах развития хронического обструктивного бронхита — продуктивный кашель, большей частью в утренние часы. [16]

Бронхиальная астма — хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в котором принимают участие тучные клетки и Т-лимфоциты. [9]

БА — является самой распространенной болезнью, которая являясь глобальным заболеванием по всему миру, охватил много миллионов человек. На сегодняшний день бронхиальная астма остается одним из актуальных медико-социальных проблем. БА привлекла к себе большое внимание

исследователей многие годы, особенно в странах Западной Европы и в странах Восточной Европы в 1993 году по инициативе Национального института сердца легких и крови была создана рабочая группа из ведущих мировых экспертов, которые занимаются бронхиальной астмой. Результатом деятельности этих ученых была программа «Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы» (Global Initiative for Asthma, GINA). Включая, 2002 г по 2014г произошли большие изменения GINA, касающихся: определения болезни, диагноза БА, оценки контроля симптомов и факторов риска и терапия БА, максимальная польза можно получить от доступных лекарственных средств, при правильном лечении. [4]

1.2 Pod *Moraxella*.

Моракселлы (род *Moraxella*) и бранхамеллы (подрод *Branhamella*). Бактерии рода *Moraxella*, являются представителями нормальной микрофлоры слизистых оболочек верхних дыхательных путей человека и некоторых животных. Наличие грамотрицательных бактерий, высокоактивных протеаз позволяет клеткам *Moraxella* преодолевать барьерные функции слизистых оболочек и колонизироваться в месте выходных ворот.

Среди 21 видов *Moraxella* наибольшим комплектом генетическим маркеров вирулентности обладает *M.catarrhalis*. Замечено, что у лиц накануне перенесших вирусных инфекции, переливают штаммы, обладающие в среднем меньшей адгезивной активностью, чем у лиц первичной бактериальной инфекцией. Это выясняется тем, что поврежденный в результате вирусных частиц слизистый слой не может противостоять обитающим на нем бактериальным клеткам. После успешной адгезии микроорганизмов начинается следующий этап — инвазия (способ проникать в ткани которые лежат за границей входных ворот инфекции и размножаться в них). [6]

Таксономия. Род *Moraxella* включает два подрода. Подрод *Moraxella* объединяет 6 видов бактерии: *Moraxella bovis*, *Moraxella atlantae*, *Moraxella nonliquefaciens*, *Moraxella phenylpyruvica*, *Moraxella osloensis*. К подроду *Branhamella* относятся следующие виды бактерий: *Branhamella* (*Moraxella*) *catarrhalis*, *Branhamella caviae*, *Branhamella ovis*, *Branhamella cuniculi*. [7]

Эпидемиология и клиника. Бактерии рода *Moraxella* обнаруживается в норме слизистых оболочка верхних дыхательных путей человека и животных. Однако способны вызывать различные заболевания, преимущественно у людей со сниженной иммунологической реактивностью. Моракселлы могут вызывать у человека эндокардит, конъюнктивит, менингит, уретрит, различные респираторные инфекции (бронхит, пневмонию, фарингит, отит, синусит). Они характеризуются различной локализацией и клинической симптоматикой. [1]

Все виды *Moraxella spp.* могут быть разделены на 3 группы: 1) преимущественная, почти исключительная экологическая ниша – слизистая оболочка глаз; 2) экологическая ниша – слизистые верхних дыхательных путей, преимущественно полости носа; обнаруживается в крови, спинномозговой жидкости и других патологических материалах вне экологической ниши; 3) экологическая ниша – слизистые верхних дыхательных путей или женских гениталий и выделение при воспалительных процессах из тех же локусов.

Moraxella catarrhalis

Moraxella catarrhalis — это мелкие грамотрицательные кокки или капсулы, часто располагаются парами. Они Аэробные, неподвижные, не образует спор.

Клеточная стенка содержит истинные воски. Все бактерии рода *Moraxella* образуют капсулу. Они неподвижны. Могут иметь фимбрии, благодаря наличию которых имеют способность к движению по твердой поверхности рывками.

Чаще встречаются культуры, клетки которых имеют форму кокков, они обычно мелкие, расположены одиночно или попарно; соприкасающиеся стороны клеток уплощены.

Moraxella catarrhalis — обладает молекулами адгезии, позволяющими бактериям связываться с клетками слизистой оболочки человека. В аэробных условиях они обычно не образуют кислоты из глюкозы. [21]. Неспособны к денитрификации, использованию в качестве источников углерода и энергии многих углеводов, многоатомных спиртов, ароматических соединений. Не продуцируют индол и сероводород. Большинство культур использует лактат и в меньшей степени пируват. К факторам патогенности моракселл следует отнести наличие эндотоксина и фимбрий

По потребностям в питательных веществах все виды моракселл делятся на 2 группы: I — виды, использующие для построения своих белков высокомолекулярные органические животные вещества; II — виды, строящие свои белки из неорганических соединений с использованием лишь единичных органических компонентов, а также довольствующиеся простыми органическими комплексами[39].

Moraxella catarrhalis растет на кровяном агаре, через 20-24 часа роста образуют колонии небольших размеров с зоной гемолиза или без нее. Культуры, имеющие капсулу, часто растут в виде больших слизистых колоний. Для выделения микроорганизма со слизистых используют селективные среды, подавляющие рост другой микрофлоры (модифицированную среду Тайера—Мартина и среду Мюллера—Хинтона с добавлением триметоприма и ванкомицина).

Moraxella catarrhalis — аэробы. Оптимальная температура роста 33—35 °С, способны расти и при 22 °С. Все бактерии рода *Moraxella* очень требовательны к составу питательных сред, нуждаются в добавлении

аминокислот, биотина, лактата (сукцината) в качестве источника углерода и энергии.[24].

1.3 Род *Pseudomonas*

Род *Pseudomonas* включает вид *Pseudomonas aeruginosa* — синегнойную палочку. Род грамотрицательных аэробных неспорообразующих бактерий. [14] *Pseudomonas* — Подвижны имеют форму изогнутых, параллельно расположены жгутиков. род *Pseudomonas* — виды *Pseudomonas mallei*— возбудитель сапа и *Pseudomonas pseudomallei*— возбудитель, вызывающий мелиоидоз и другие. К роду *Pseudomonas* относятся многочисленные виды бактерий (*P. Aeruginosa*, *P. Alcaligenes*, *P. Chloraphis*, *P. Fluorescens*, *P. Mendocina*, *P. Monteilii*, *P. Oryzihabitans*, *P. Petrocinogena*, *P. Pseudoalcaligenes*, *P. Putida*, *P. Stutzeri*) [2]

Pseudomonas aeruginosa

А. Люкке в 1862 г. было впервые описано гнойное раневое отделяемое, окрашивающее повязки сине-зеленый цвет вызванное *Pseudomonas aeruginosa*. В чистой культуре *Pseudomonas aeruginosa* была выделена в 1882 г. С. Жессаром.

Морфологические свойства. *Pseudomonas aeruginosa* — подвижны за счет наличия одного, редко двух противоположно расположенных жгутиков. Это грамотрицательные прямые палочки размером 1—3 мкм, расположенные одиночно, попарно или в виде коротких цепочек. Спор не образуют, имеют, пили (фимбрии). При определенных условиях смогут продуцировать капсулоподобную внеклеточную слизь полисахаридной природы.

Культуральные свойства. *P. aeruginosa* — облигатные аэробы, которые хорошо растут на простых питательных средах. На МПА образуют колонии размером 2-5 мм, круглые, полупрозрачные, голубовато-серые с перламутровым оттенком [18]. Для выделения чистой культуры синегнойной

палочки применяют селективные или дифференциально-диагностические питательные среды с добавлением антисептиков — малахитовый агар с добавлением бриллиантового зеленого. На жидкой питательной среде (МПБ) бактерии образуют характерную серовато-серебристую пленку на поверхности. На кровяном агаре вокруг колоний синегнойной палочки наблюдаются зоны гемолиза. Оптимальная температура роста 37 °С, однако *P. aeruginosa* способна расти при 42 °С, что позволяет отличать ее от других псевдомонад. [22].

Основной метод диагностики - бактериологическое исследование клинического материала (кровь, гной и раневое отделяемое, моча, мокрота), которое позволяет не только идентифицировать возбудителя, но и определить чувствительность бактерий к антимикробным препаратам. При идентификации учитывают рост на агаре, положительный цитохромоксидазный тест, выявление термофильности (рост при 42С). Для внутривидовой идентификации бактерий применяют серотипирование. Серологический метод исследования направлен на обнаружение специфических антител к антигенам палочки (обычно экзотоксину А и ЛПС) с помощью РСК, РПГА. [23]

Лечение инфекций, вызванных Псевдомонадами, главным образом – антибактериальное (цефалоспорины, β-лактамы, аминогликозиды). Тяжелые формы лечатся плазмой из крови, иммунизированной поливалентной корпускулярной синегнойной вакциной. Для местного лечения применяют антисинегнойный гетерологичный иммуноглобулин. Для лечения гнойных инфекций кожи, ожогов – синегнойный бактериофаг.

Профилактика: специфическая – стерилизация, дезинфекция, антисептика. Контроль за обсемененностью внешней среды. Неспецифическая – иммуномодуляторы. Пассивная специфическая иммунизация гипериммунной плазмой. Для создания активного иммунитета

– вакцины (поливалентная корпускулярная синегнойная вакцина, стафило–протейно-синегнойная вакцина).

1.4 Род *Haemophilus*.

Вид *Haemophilus influenzae* относится к роду *Haemophilus*, который входит в семейство Pasteurellaceae, порядок Pasteurellales, класс γ proteobacteria, тип Proteobacteria, царство Бактерии.

Haemophilus influenzae или палочка Афанасьева-Пфейффера, была выделена во время пандемии гриппа в 1889 году. Микробиологические и иммунологические свойства *H. influenzae* были открыты М.Питтман в 1930. В 1933 г Фотергиллом и Райтом была обнаружена зависимость заболеваемости *Haemophilus influenzae* от возраста. Относится к семейству Pasteurellaceae, роду гемофилюсов.

Морфология. *Haemophilus influenzae* — вид грамотрицательных бактерий неподвижная, овоидная, палочковидная коккобацилла, размером 0,2-0,3 на 0,3-0,5 мкм. Располагается одиночно, попарно и скоплениями, иногда образует капсулу. Жгутиков не имеет. [25]

Источником и объектом поражения *Haemophilus influenzae* является только человек. Резервуаром инфекции чаще всего оказываются бактерионосители или больные острыми респираторными заболеваниями, протекающими в легкой или клинически невыраженной форме, когда они не изолируются.

Путь распространения — воздушно-капельный. Возбудитель локализуется на слизистой оболочке верхних дыхательных путей. *H. influenzae* можно выделить из носоглотки 90 % здоровых людей, причем на более вирулентный тип приходится около 5 % всех выделенных штаммов. Здоровое носительство может продолжаться от нескольких дней до нескольких месяцев. Носительство сохраняется даже при высоком титре специфических антител и даже при назначении высоких доз антибиотиков.

Чаще всего заболевают дети в возрасте от 6 мес до 4 лет, реже болеют новорожденные, дети более старшего возраста и взрослые.[36]

Микробиологическая диагностика. Материал для исследования — мазок из носоглотки, кровь, мокрота или ликвор. При отитах или синуситах исследуют также гнойное отделяемое, а при септических артритях — суставную жидкость.[36].

Методы диагностики. Микроскопическое исследование малоинформативно, однако применяется при гнойном менингите (изучение мазков из цереброспинальной жидкости, окрашенных по Граму). Для ускоренной диагностики и дифференциации гемофильной палочки.[35]

Культуральные свойства. Оптимальная температура роста 37⁰С. На кровяном агаре с добавлением сердечно-мозгового экстракта через 24 часа появляется рост мелких колоний с радужными переливами, гемолиз отсутствует. У бескапсульных вариантов радужная расцветка не выявляется. На жидких средах с кровью рост чаще диффузный, реже – придонный. Длительность роста – 36-48 часов. Нуждаются для своего роста в наличии биотина, фолиевой кислоты, ниацина, тиамина, рибофлавина. Оптимальные среды для роста – Шоколадный агар , агар Левинталя и среда с переваром Файлдса. Кроме указанных факторов, для анаэробного роста микроорганизмы утилизируют и другие продукты, содержащиеся в эритроцитах, такие как - протопорфирин IX, пиридиннуклеотиды и др. [37].

Для ускоренной диагностики и дифференциации *H. influenzae* от других возбудителей пневмоний используют серологические тесты с целью обнаружения b-капсульного антигена *H. influenzae*, встречный иммуноэлектрофорез, прямую РИФ или реакцию латекс-агглютинации с анти-b-антителами. При высокой концентрации возбудителя в исследуемом материале вероятно также постановка теста «набухания капсулы». Для выделения и идентификации патогена из материала от больных наряду с бактериологическим и серологическим исследованиями применяют ПЦР.

При постановке ПЦР для выбора праймера с целью определения принадлежности возбудителя к роду *H. influenzae* используют ген бактериальной 16S рибосомальной РНК.

1.5 Род *Streptococcus*

Впервые стрептококки были описаны Пастером в 1871 г. Род кокковых грамположительных бактерий, относящихся к типу Firmicutes, класс Bacilli, порядок Lactobacillales. Клеточное деление у этих бактерий происходит вдоль одной оси. *Streptococcus* является представителем нормальной микрофлорой носоглотки, при определенных условиях он может вызвать как инвазивные (менингит, бактериемия), так и неинвазивные (отит, синусит, пневмония) инфекции [30].

Streptococcus pneumoniae

Морфология. *Streptococcus pneumoniae*— это маленькие шаровидные клетки, в мазках находятся парами цепочками, грамположительные, жгутиков не имеют, спор не образуют.

Культуральные свойства. Факультативные анаэробы, хемоорганотрофы. Требовательны к питательным средам. На плотных средах образуют мелкие колонии сероватого цвет. Растут на питательных средах, обогащенных кровью, сывороткой. pH 7,2—7,6, t— 37C. [37]. В средах для выделения пневмококка необходимо высокое содержание аминного азота и нативного животного белка. Обычно для этого к среде добавляют кровь лошади или барана либо используют готовые специализированные пневмококковые среды. Кровь добавляют также с целью контроля вероятной гемолитической реакции, благодаря которой можно идентифицировать микроорганизм. Кроме того, инкубация требует повышенного содержания CO₂ (5%), что достигается при применении CO₂-термостата или же эксикатора с зажженной свечей. Цитратная кровь не пригодна для исследования. Для приготовления кровяного агара используют основу для кровяного агара (Blood agar base), колумбийский агар

(Columbia agar), агар для бруцелл (Brucella agar), эритроит-агар, шоколадный агар (Chocolate agar), ГРМ-агар и др. Вероятность выделения микроорганизма увеличивается при добавлении к среде селективных добавок, подавляющих рост других микроорганизмов (например, гентамицин в концентрации 5 мг/л). Чтобы дифференцировать пневмококк от пиогенных стрептококков, используют тест с оптохином и/или тест лизиса с желчью (солями желчных кислот) [29]. Культивирование гемофильной палочки требует наличия в питательных средах X и/или V факторов роста. X и V факторы присутствуют в крови, но в бараньей и человеческой крови находятся ферменты (НАДазы), разрушающие V фактор. Поэтому V-зависимые виды гемофилы плохо или совсем не растут на кровяном агаре, приготовленном на основе бараньей или человеческой крови.[38]

Путь передачи воздушно-капельный и контактный. Основной резервуар инфекции — больной человек или носитель.

Патогенез поражений. *Streptococcus* на поверхности клетки имеется белковый антиген М группы, также А обладают адгезивными свойствами, который препятствует фагоцитозу. Эти свойства присущи патогенным микроорганизмам антимикробного потенциала фагоцитов и облегчают адгезию к эпителию.[31]

Клинические проявления пневмонии. При крупозной пневмонии поражаются доли или все легкое. Заболевание начинается внезапно: повышается температура, озноб, сухой кашель и боли в грудной области. У пожилых людей, наоборот, заболевание развивается медленно, с нарушением сознания и признаками легочно-сердечной недостаточности.

Важным фактором заболеваемости пневмококковыми инфекциями считают носоглоточное носительство *S. pneumoniae*, уровень которого колеблется от 20 до 50% случаев в зависимости от сезона и организованности

популяции. [33]. Адгезивная активность, обусловленная взаимодействием пневмококковых поверхностных адгезинов и рецепторов эпителиальных клеток, отражает процесс колонизации и носоглоточного носительства *S. Pneumoniae*. [34].

Streptococcus pyogenes

Морфология. Стрептококки – это кокки, имеющие шаровидную форму. Диаметр каждого кокка в среднем 0,6-1 мкм, однако встречаются мелкие и крупные кокки, строго шаровидные и овальные. Стрептококки располагаются цепочкой, что является результатом деления их в одной плоскости. [29].

Культивирование. Стрептококки - факультативные анаэробы. Растут при температуре 37° С и рН среды 7,6-7,8. самыми оптимальными средами для их выращивания, которые содержат кровь или сыворотку крови. На плотных питательных средах колонии стрептококков видны мелкие, плоские, мутные, сероватого цвета. [43]. На агаре с кровью некоторые разновидности стрептококков образуют гемолиз. β-Гемолитические стрептококки проявляют четкую зону гемолиза, α-гемолитические стрептококки образуют небольшую зеленоватую зону (результат перехода гемоглобина в метгемоглобин). Встречаются стрептококки, не дающие гемолиза. На сахарном бульоне стрептококки растут с образованием пристеночного и придонного мелкозернистого осадка, бульон при этом остается прозрачным.

Ферментативные свойства. Стрептококки обладают сахаролитическими свойствами. Они расщепляют глюкозу, лактозу, сахарозу, маннит (не всегда) и мальтозу с образованием кислоты. Протеолитические свойства у них слабо выражены. Они свертывают молоко, желатин не разжижают.

Пути передачи. Воздушно-капельный и воздушно-пылевой, иногда пищевой, возможен контактно-бытовой.

Заболевания могут появляться в результате экзогенного заражения, а также эндогенно - при активации условно-патогенных стрептококков, живущие на слизистых оболочках зева, носоглотки, влагалища. Уменьшение сопротивляемости организма (охлаждение, голодание, переутомление и пр.) может привести к образованию аутоинфекций.[39].

Большое значение в патогенезе стрептококковых инфекций имеет предварительная повышенная чувствительность - как следствие ранее перенесенного заболевания стрептококковой этиологии. При проникновении в кровяное русло стрептококки обуславливают тяжело протекающий септический процесс.

Антигенная структура. У стрептококков обнаружены различные антигены. В цитоплазме клетки содержится видовой нуклеопротеидной природы антиген - единый для всех стрептококков. На поверхности клеточной стенки расположены протеиновые типовые антигены. В клеточной стенке стрептококков обнаружен полисахаридный групповой антиген.

По составу полисахаридной группоспецифической фракции антигена все стрептококки делятся на группы, обозначаемые большими латинскими буквами А, В, С, D и т. д. до S. Кроме групп, стрептококки разделены на серологические типы, которые обозначаются арабскими цифрами.[42].

Токсинообразование. Стрептококки образуют ряд экзотоксинов: 1) стрептолизины - разрушают эритроциты (О-стрептолизин обладает кардиотоксическим действием); 2) лейкоцидин - разрушает лейкоциты (образуется высоковирулентными штаммами); 3) эритрогенный (скарлатинозный) токсин - обуславливает клиническую картину скарлатины - интоксикацию, сосудистые реакции, сыпь и пр. Синтез эритрогенного токсина детерминирован профагом; 4) цитотоксины - обладают способностью вызывать гломерулонефрит.[29]

1.6 *Pod Listeria*

Род *Listeria* (сем. *Corynebacteriaceae*) состоит из 6 видов, в том числе патогенный для человека и теплокровных животных вид *L. monocytogenes*. *L. ivanovii* патогенна только для животных. Оставшиеся виды листерий – *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi* и *L. welshimeri* непатогенны для человека и животных. Из шести распространенных видов этого рода *Listeria monocytogenes* требует особого внимания, поскольку представляет собой возбудителем заболеваний и человека, и животных

Listeria monocytogenes

Листерииоз является редкое инфекционное заболевание человека, сельскохозяйственных животных и грызунов, вызываемое патогенными палочковидными бактериями *Listeria monocytogenes*.

Морфология клеток и колоний. Аспорогенные, палочковидные (коккоподобные), грамположительные, хемоорганотрофные факультативно-анаэробные бактерии. Имеют форму коротких прямых палочек (размером 0,4–0,5 x 0,5–2 мкм), с закругленными концами. Располагаются одиночно, либо короткими цепочками (из 3-5 клеток), реже – в виде длинных нитей. Капсулу не образуют. На питательных средах дает мелкие (1-2 мм), гладкие, плоско-выпуклые, удлиненной или нитевидной формы колонии, полупрозрачные, голубовато-серые (в проходящем свете) и зеленые (при косом освещении). R-колонии характеризуются утолщенным зазубренным краем и грубозернистой массой, достигающей 1,5-3 мм. При культивировании на жидких средах культура дает равномерное помутнение с дальнейшим выпадением осадка. На полужидких средах рост колоний (более обильный у поверхности) происходит по уколу. Культура обладает запахом творога или молочной сыворотки, что и предопределило накоплением продуктов углеводного обмена.

Листерии устойчивы во внешней среде. Растут в широком интервале температур (от 1 до 45°C) и pH (4-10). При 4–6°C листерии способны размножаться в мясе, молоке, масле, сыре, других продуктах, а еще в почве, воде, на растениях и в трупных тканях. В различных кормах бактерии сохраняют жизнеспособность до 3 лет. Клетки подвижны при 20-25°C, температурный оптимум для роста 30-37°C, оптимум pH=7,2–7,4. Ферментируют глюкозу, левулезу, рамнозу, дисахариды (мальтозу), полисахариды (декстрин), гликозиды (салицин); к манниту и крахмалу инертны. Тест на каталазу положительный, на оксидазу отрицательный. Содержат цитохромы и фаголизабелен

Методы обнаружения. Профилактика листериоза включает постоянный контроль за пищевыми продуктами, предусмотренный соответствующими нормативными документами, в свою очередь регулярную проверку сельскохозяйственных и домашних животных. Животноводческие хозяйства, где установлена инфекция, объявляют неблагополучными. Запрещают ввод и вывод животных.

Питательные среды для выделения *Listeria monocytogenes*[^]

- Селективный бульон Фразера (или бульон UVM)
- Хромогенный агар Оттавиани-Агости

Альтернативные методы:

- 1) Модифицированные питательные среды на подложке - 3M Petrifilm (EL) Environmental Listeria Plate (Петрифилмы для подсчета листерий в смывах)
- 2) Иммунохроматографические экспресс-тесты - Singlepath®-L'mono
- 3) ПЦР-анализ в реальном времени - foodproof
- 4) Система молекулярного анализа патогенов - 3M Molecular Detection System (MDS).

1.7 *Pod Klebsiella*

Название дано в честь Э. Клебса. Род *Klebsiella* входит в семейство Enterobacteriaceae, порядок Enterobacteriales, класс γ -proteobacteria, тип Proteobacteria, царство Бактерии. Клебсиеллы относятся к так называемым колиформным бактериям

Klebsiella pneumoniae

Морфология. *Klebsiella pneumoniae*— толстые короткие палочки размером 0,3—1,25 мкм, с закругленными концами, неподвижные. Спор не образуют. В мазках располагаются попарно или одиночно, обычно окружены капсулой, грамотрицательны. Хорошо растут на простых питательных средах при температуре 35—37°C. На мясо-пептонном агаре создают мутные слизистые колонии, в бульоне — сильное помутнение.

Антигены. Клебсиеллы не образуют экзотоксинов, содержат эндотоксины. Капсульные бактерии включают три антигена: капсульный (K-антиген), соматический гладкий (O-антиген), соматический шероховатый (R-антиген); K- и O-антигены являются углеводами, R-антиген — протеином.

Микробиологическая диагностика. Проводится с помощью микробиологического и серологического методов. Исследуемый материал: мокрота (при пневмонии), слизь из зева, носа, трахеи (при озе), кусочки ткани из гранулем (при риносклероме). Посевы производят на мясо-пептонный или глицериновый агар, а также на дифференциальные среды—бромтимоловый или бромкрезоловый агар. Инкубируют при 37°C. Через 24 ч из выросших слизистых колоний делают пересев на скошенный агар. Изучают ферментативные свойства полученной чистой культуры

Бактериологическое исследование Посев материала производят на селективную среду K-2 (МПА с мочевиной, рафиноза, бромтимоловый синий). Через сутки на нем вырастают крупные, выпуклые, блестящие, зеленовато-

желтого, слизистые колонии желтого или голубого цвета. На средах Эндо и Плоскирева образуют колонии с металлическим блеском, характерные для лактозоположительных бактерий. На глицериновом или простом агаре через 2-4 ч выращивания основные виды клебсиелл образуют характерные колонии с разной внутренней структурой, выявляемые при агар-микроскопии таких молодых колоний. Идентификацию последних проводят посевом в среды пестрого ряда Гисса, желчный бульон, определяют подвижность, наличие уреазы. Клебсиеллы неподвижные, большинство штаммов разлагают глюкозу, лактозу, сахарозу, мочевины, дают положительную реакцию Фогес - Проскауэра, не выделяют сероводород. И все же главной и достоверной является серологическая идентификация клебсиелл. Для ее проведения используют две реакции: капсульную агглютинацию на стекле с живой культурой и О-агглютинацию. При постановке первой из них на предметное стекло наносят диагностические протиклебсиеллезные капсульные сыворотки, а также каплю 0,9% раствора хлорида натрия (контроль). У каплей сывороток и изотонического раствора растирают полную петлю исследуемой культуры, смешивают их, добиваясь тщательной гомогенизации. При положительном результате выходит агглютинат в виде грубых нитей или тяжей. В контрольной капле агглютинации не должно быть. Для О-агглютинации выделены культуры стерилизуют в автоклаве в течение 150 мин при 2-х атм. При этом разрывается капсула, культура не взаимодействует с К-сыворотками и агглютинируется О-сыворотками. Простерилизованную культуру надо дважды отмыть в физиологическом растворе путем центрифугирования и с осадком поставить реакцию агглютинации на стекле. Из дополнительных методов идентификации клебсиелл используют фаготипирования. Фаги капсульных бактерий имеют четкую видовую специфичность.[44].

Серологические исследования проводят путем постановки развернутой реакции агглютинации с сывороткой крови больных и капсульный и безкапсульным антигенами, а также связывания комплемента и более чувствительной

и специфической реакции непрямой гемагглютинации с эритроцитарным клебсиеллезным диагностикумом. Для постановки последней сыворотку больных разводят в лунках полистироловых планшетов от 1:20 до 1:320 в объеме 0,25 мл и добавляют такой же объем 1% взвеси чувствительных эритроцитов. Учет результатов проводят через 2 ч экспозиции планшетов при 37 ° С. Диагностический титр 1:160 и выше. Надежные результаты получают при постановке реакции в динамике, когда обнаруживают четырехкратное возрастание титра антител.

Глава II. Материалы и методы исследования

2.1 Объекты исследования

Объекты исследования - 68 пациентов в возрасте 18-75 лет находящихся на стационарном лечении в пульмонологических отделениях больниц г.Уфы в период с сентября 2017 по февраль 2018г. с различными диагнозами патологий органов дыхания, а именно: внебольничная пневмония, бронхиальная астма, бронхит, ХОБЛ различной степени тяжести.

Метод проведения исследования — практическая часть эксперимента была выполнена на базе Башкирского Государственного Медицинского университета (кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии).

Материал для исследования — является утренняя порция мокрота, выделяющаяся у больных во время приступа кашля, натошак.

2.2 Выделение ДНК

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

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

Состав набора «ДНК-сорб-АМ»:

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

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

Подготовка к проведению процедуры выделения ДНК:

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

разбрызгивания и попадания материала на внутреннюю часть крышки.

Процедура выделения ДНК.

1. В подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки внести по 10 мкл ВКО-комплексного (внутренний контрольный образец для проведения ПЦР с электрофоретической детекцией).

2. Ресуспендировать сорбент и внести в каждую пробирку по 20 мкл сорбента универсального, после чего по 300 мкл лизирующего раствора, используя наконечники с аэрозольным барьером.

3. Внести по 100 мкл мокроты, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром. В пробирку отрицательного контроля внести 100 мкл ОКО (отрицательный контрольный образец).

4. Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе и инкубировать 5 мин при 65°C в термостате. После окончания инкубации содержимое повторно перемешать на вортексе и оставить при комнатной температуре на 2 мин.

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

6. Добавить в пробы по 1 мл отмывочного раствора, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

7. Повторить п.5.

8. Поместить пробирки в термостат с температурой 65°C на 5-10 мин для подсушивания сорбента, при этом крышки пробирок должны быть открыты.

9. В пробирки добавить по 100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК, используя наконечник с фильтром. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Поместить в термостат с температурой 65°C на 5 мин.

10. Центрифугировать пробирки при 12 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР

2.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для достижения поставленных в нашем исследовании целей, использовали ранее подобранные ранее праймеры к специфическим консервативным последовательностям ДНК микроорганизмов *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* - генам 16S рРНК, депонированным в международном банке нуклеотидных последовательностей EMBL/GenBank, свойственных только для данных микроорганизмов, последовательностей ДНК.

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе.

Название праймера	Последовательности нуклеотидов, Нуклеотидная последовательность праймеров	Темп. Отжига	Ожидаемый размер продукта (пн)
MaraF/MaraR	5'-caagtcgaacgaagtaggaagcttgcttctg -3' 5'- gattaacgcttgaccctctgtattaccgc -3'	60°C	489
P.aeruginF/ P.aerugin R	5'- agaaagtgggggatcttcggacctc -3' 5'-tgttggtaacgtcaaaacagcaaggtattaactt-3'	60°C	292
H.influenzaeF/ H. Influenza R	5'-gaagaagtgtttcagaagcttctcc3' 5'-acggatccagtggtccgtttccag-3'	60°C	292
S.pneumoniaeF/ S.pneumoniaeR	5'-aacgcttgaccctctgctgtatcttcgga-3' 5'-taacgtcaaaacagaggtatctaagacct-3'	65°C	290
S.pyogenesF/ S.pyogenesR	5'-acaagctcatgagctcttcttagg-3' 5'-tgtgattatagcctaagacccggag-3'	60°C	290
L.monocytog	5'-caagtcgacgaagtagggcttgcttctg -3'	62°C	510

Название праймера	Последовательности нуклеотидов, Нуклеотидная последовательность праймеров	Темп. Отжига	Ожидаемый размер продукта (пн)
enesF/L.monocytogenesR	5'- gattacgctcaccctctgtattactttgcgctac - 3'		
K.pneumoniaeF/K.pneumoniaeR	5'- gattacgctcaccctctgtattactttgcctac -3' 5'-taacgtcaaaacagaggtatctaagacct-3'	60°C	290

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

1. Расположить в штатив буфер Таq-полимеразы, DNTP, растворы праймеров для разморозки, затем ресуспендировать на вортексе. Таq-полимеразу необходимо хранить в морозильнике, избегать долгого нахождения на рабочем месте без холодного штатива.
2. Отобрать пинцетом необходимое количество одноразовых стерильных полипропиленовых пробирок объемом 0,6 мл, промаркировать и расставить в штатив соответствующим образом.
3. Приготовить амплификационную смесь для общего количества анализируемых проб в пробирке на 1,5мл и разлить по 22мкл в каждую пробирку для амплификации на 0,6мл.

Реакционная смесь на одну пробирку:

14,5мкл mQ

2,5мкл dNTP

2,5мкл Таq Буфер

1мкл праймера forward

1мкл праймера reverse

0,5мкл Taq-полимеразы

4. В каждую пробирку внести по 3мкл ДНК исследуемого образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром.
5. Во избежания испарения жидкости на поверхность каждой реакционной смеси наливаем 1 калю вазелинового масла.
6. Пробирки закрыть, центрифугировать 5с при 3000об/мин на микроцентрифуге-вортексе.
7. Перенести пробирки в прогретый до 94°С амплификатор.

На ДНК-амплификаторе запустить необходимую программу со следующими параметрами:

Программа амплификации:

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

где X – температура отжига праймера (для каждого своя) [25].

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

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

2.4 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез в геле – это метод, который служит для разделения макромолекул на основе их размера, электрического заряда и других физических свойств. Движущей силой электрофореза является напряжение, прикладываемое к электродам на каждом конце геля. Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом, используемым для

разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. Эта методика проста, быстро осуществляется, и способна разделять фрагменты ДНК, которые не могут быть разделены надлежащим образом с помощью других процедур. Более того, локализация ДНК в геле может быть определена путем окрашивания бромистым этидием, - флуоресцентным интеркалярным красителем, в низких концентрациях.

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

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

Компоненты электрофореза в агарозном геле.

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

Буфер для электрофореза. На электрофоретическую подвижность ДНК воздействуют состав и ионная сила буфера для электрофореза. В отсутствии ионов, электропроводность минимальна, и перемещение ДНК происходит медленно, если вообще происходит. В буфере с высокой ионной силой электропроводность очень эффективна, и образуется значительное количество тепла. Существует несколько буферов для электрофореза

нативной двухцепочечной ДНК. Они содержат EDTA и Tris – ацетат (TAE), Tris – борат (TBE), или Tris – фосфат (TPE).

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

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

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

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

Процедура электрофореза.

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

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

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

Приготовление ТАЕ-буфера:

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

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

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

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

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

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

Сливали бромистый этидий в колбу, гель промывали проточной водой. Помещали на стекло УФ – трансиллюминатора «УВТ-1» («Биоком») для визуализации. Включали прибор и анализировали результаты исследования при освещении ультрафиолетом с фильтром (304 нм).

Документирование результатов проводили с использованием цифровой видеокамеры «Mintron» и программы Biotest-D» («Биоком», Россия).

Статистическая обработка

Статистические расчеты проводились при помощи программы для работы с электронными таблицами Microsoft Excel корпорации Microsoft и при помощи программы AtteStat, предназначенной для профессиональной статистической обработки данных. AtteStat выполнен в виде надстройки к электронным таблицам Microsoft Excel. Программа полностью интегрирована в интерфейс электронных таблиц, не требует никаких настроек и не конфликтует с другими программами.

Глава III. Результаты исследования и их обсуждение

3.1 Детекция *Haemophilus influenzae* в клиническом материале методом ПЦР

При исследовании мокроты для обнаружения *Haemophilus influenzae* использовались праймеры НЕМФ – 23,5 ое/мл. и НЕМР 25,9 ое/мл.

По результатам проведенного ПЦР-анализа было выявлено наличие ДНК *Haemophilus influenzae* в 14 образцах из 68.

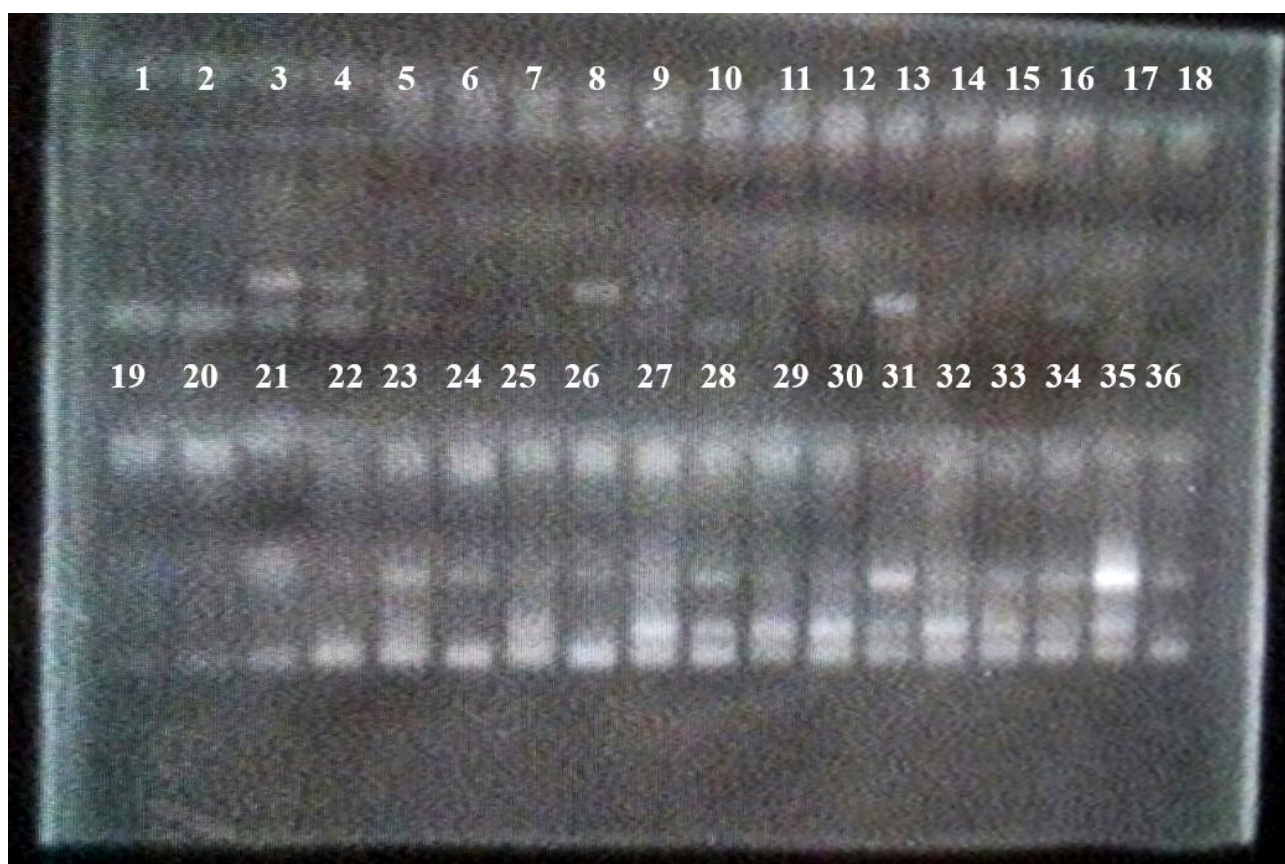


Рисунок 1: Электрофореграмма результатов амплификации ДНК чистой культуры *Haemophilus influenzae* размером 292пн и ДНК исследуемых образцов: 1 – ДНК чистой культуры *Haemophilus influenzae*; 1-36 – ДНК исследуемых образцов; 54 – отрицательный контроль.

Положительными считались пробы, в которых размер продукта соответствовал 292п.н. Напротив, у отрицательного контрольного образца

после проведения ПЦР продукт амплификации не определялся.

3.2 Детекция *Moraxella catarrhalis* в клиническом материале методом ПЦР

При исследовании мокроты для обнаружения *Moraxella catarrhalis* использовались праймеры MarakF – 30,1 ое/мл.и MarakR 26,9 ое/мл.

По результатам проведенного ПЦР-анализа было выявлено наличие ДНК *Moraxella catarrhalis* в 20 образцах из 68.

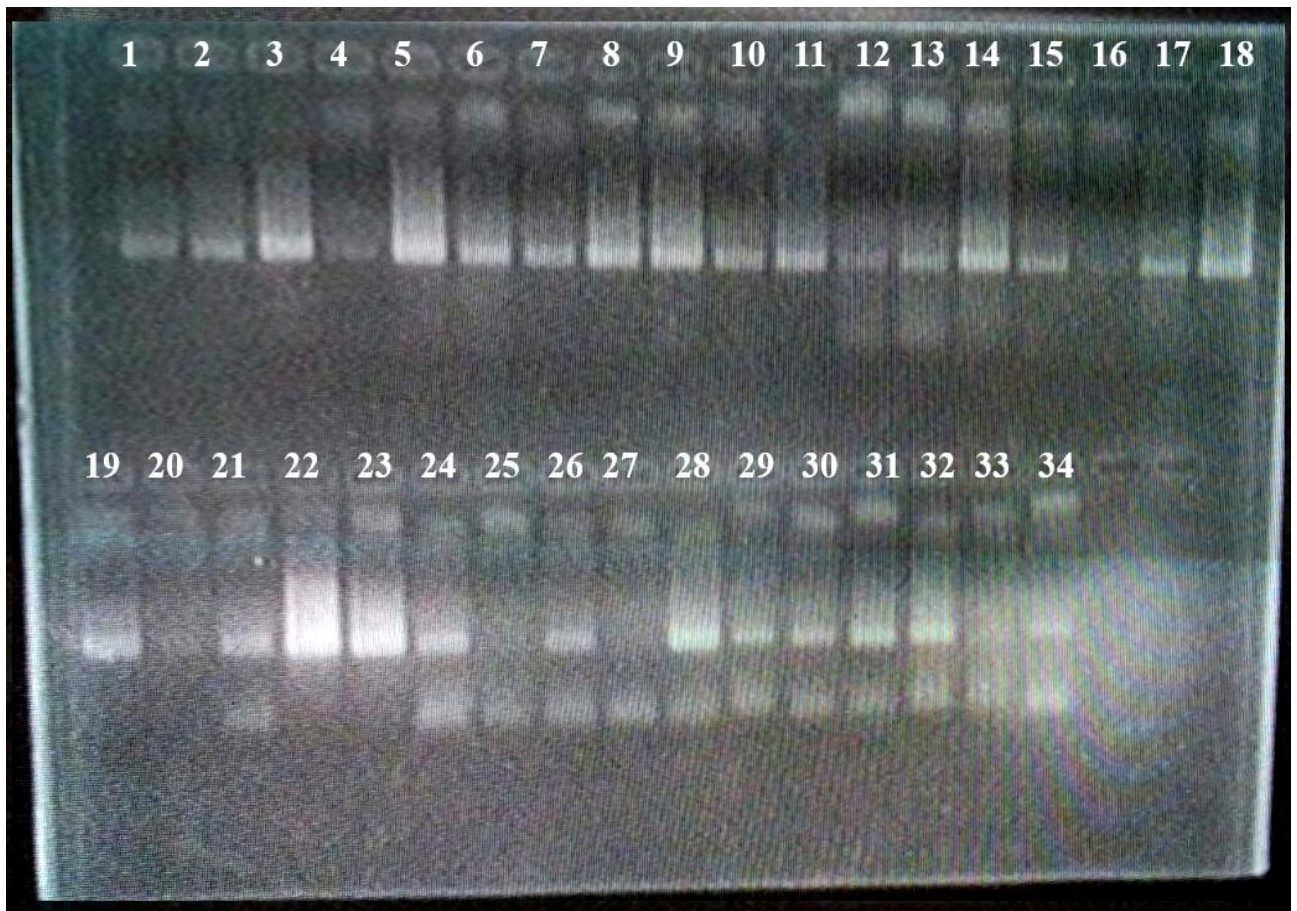


Рисунок 2: Электрофореграмма результатов амплификации ДНК чистой культуры *Moraxella catarrhalis* размером 489пн и ДНК исследуемых образцов: 1 – ДНК чистой культуры *Moraxella catarrhalis*; 1-59 – ДНК исследуемых образцов; 50 – отрицательный контроль.

Положительными считались пробы, в которых размер продукта соответствовал 489п.н. Напротив, у отрицательного контрольного образца после проведения ПЦР продукт амплификации не определялся.

3.3 Детекция *Pseudomonas aeruginosa* в клиническом материале методом ПЦР

При исследовании мокроты для обнаружения *Pseudomonas aeruginosa* использовались праймеры P. aerugF - 26,5 ое/мл; и P. aerugR - 30,4 ое/мл.

По результатам, проведенного ПЦР-анализа, было выявлено наличие ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в 11 образцах из 68.

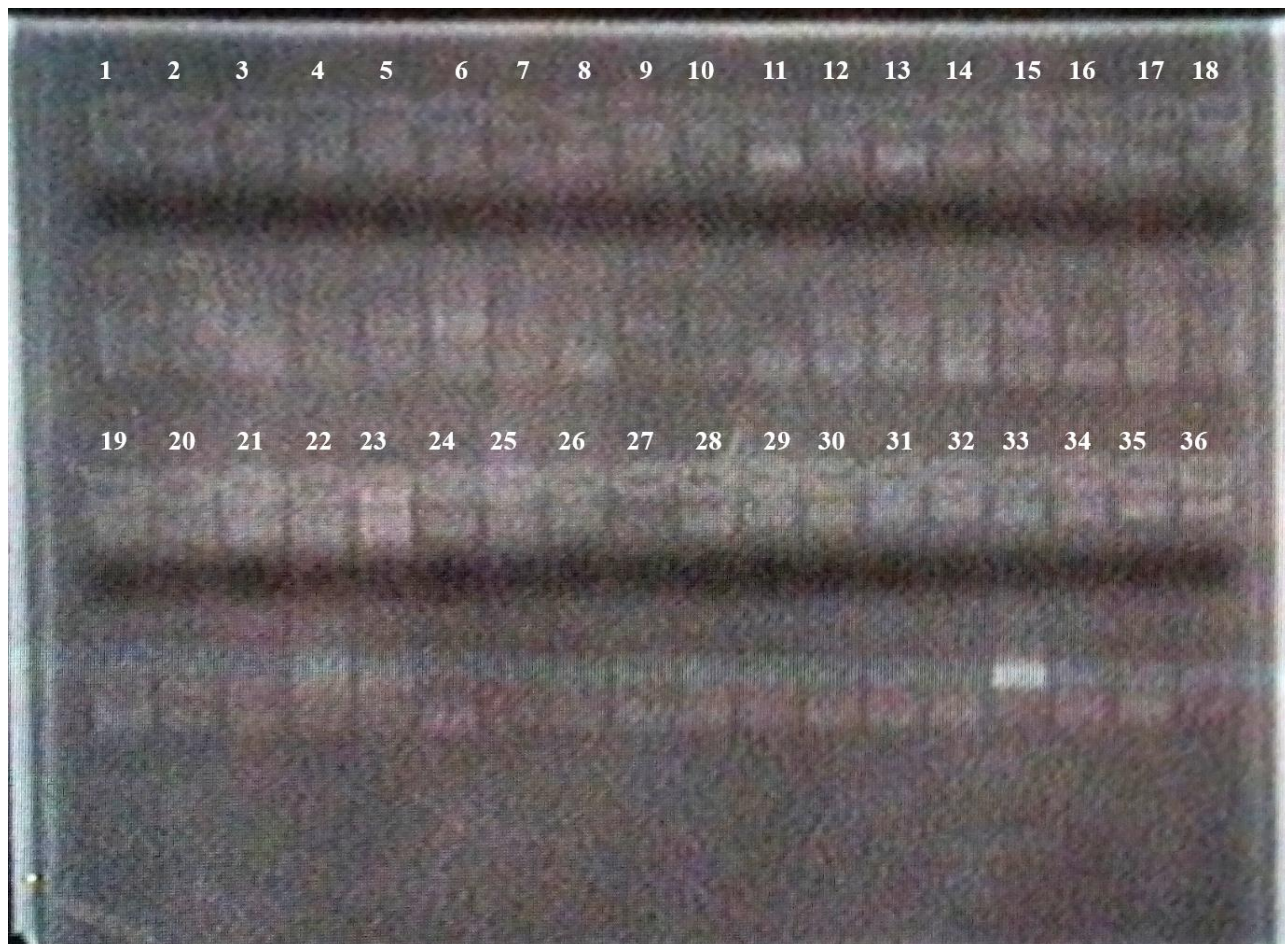


Рисунок 3: Электрофореграмма результатов амплификации ДНК чистой культуры *Pseudomonas aeruginosa* размером 292пн и ДНК исследуемых образцов: 1 – ДНК чистой культуры *Pseudomonas aeruginosa*; 1-36– ДНК исследуемых образцов; 30 – отрицательный контроль.

Положительными считались пробы, в которых размер продукта соответствовал 292п.н. Напротив, у отрицательного контрольного образца после проведения ПЦР продукт амплификации не определялся

3.4 Детекция *Streptococcus pneumoniae* в клиническом материале методом ПЦР

При исследовании мокроты для обнаружения *Streptococcus pneumoniae* использовались праймеры S.pneumF – 17,6 ое/мл.и S.pneumR 2,5 ое/мл.

По результатам проведенного ПЦР-анализа было выявлено наличие ДНК *Streptococcus pneumoniae* в 42 образцах из 68.

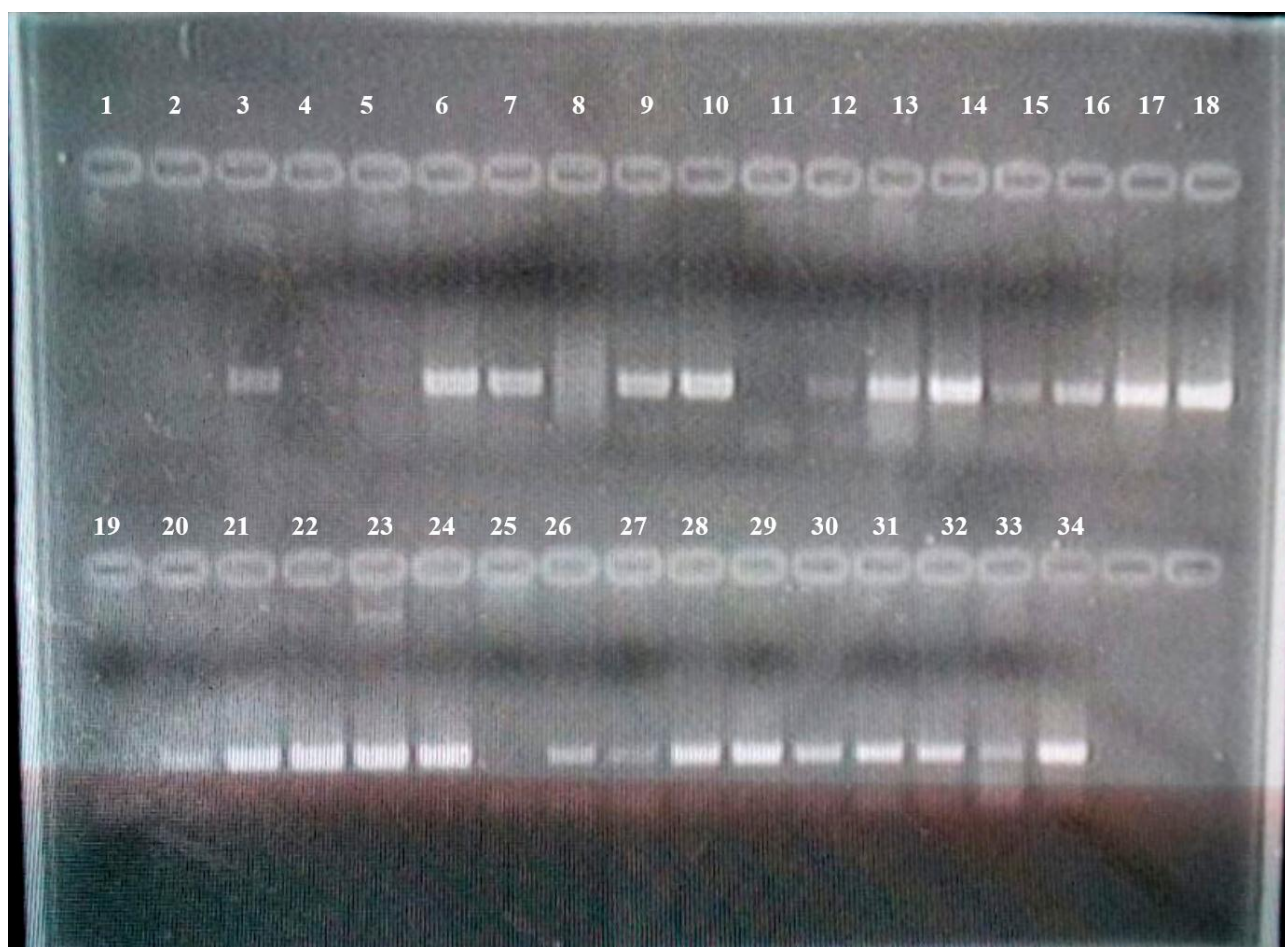


Рисунок 4: Электрофореграмма результатов амплификации ДНК чистой культуры *Streptococcus pneumoniae* размером 290пн и ДНК исследуемых образцов: 1 – ДНК чистой культуры *Streptococcus pneumoniae*; 1-68– ДНК исследуемых образцов; 30 – отрицательный контроль.

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

3.5 Детекция *Streptococcus pyogenes* в клиническом материале методом ПЦР

При исследовании мокроты для обнаружения *Streptococcus pyogenes* использовались праймеры S.pneumF – 11,4 ое/мл.и S.pneumR 13.0 ое/мл.

По результатам проведенного ПЦР-анализа было выявлено наличие ДНК *Streptococcus pyogenes* в 39 образцах из 68.

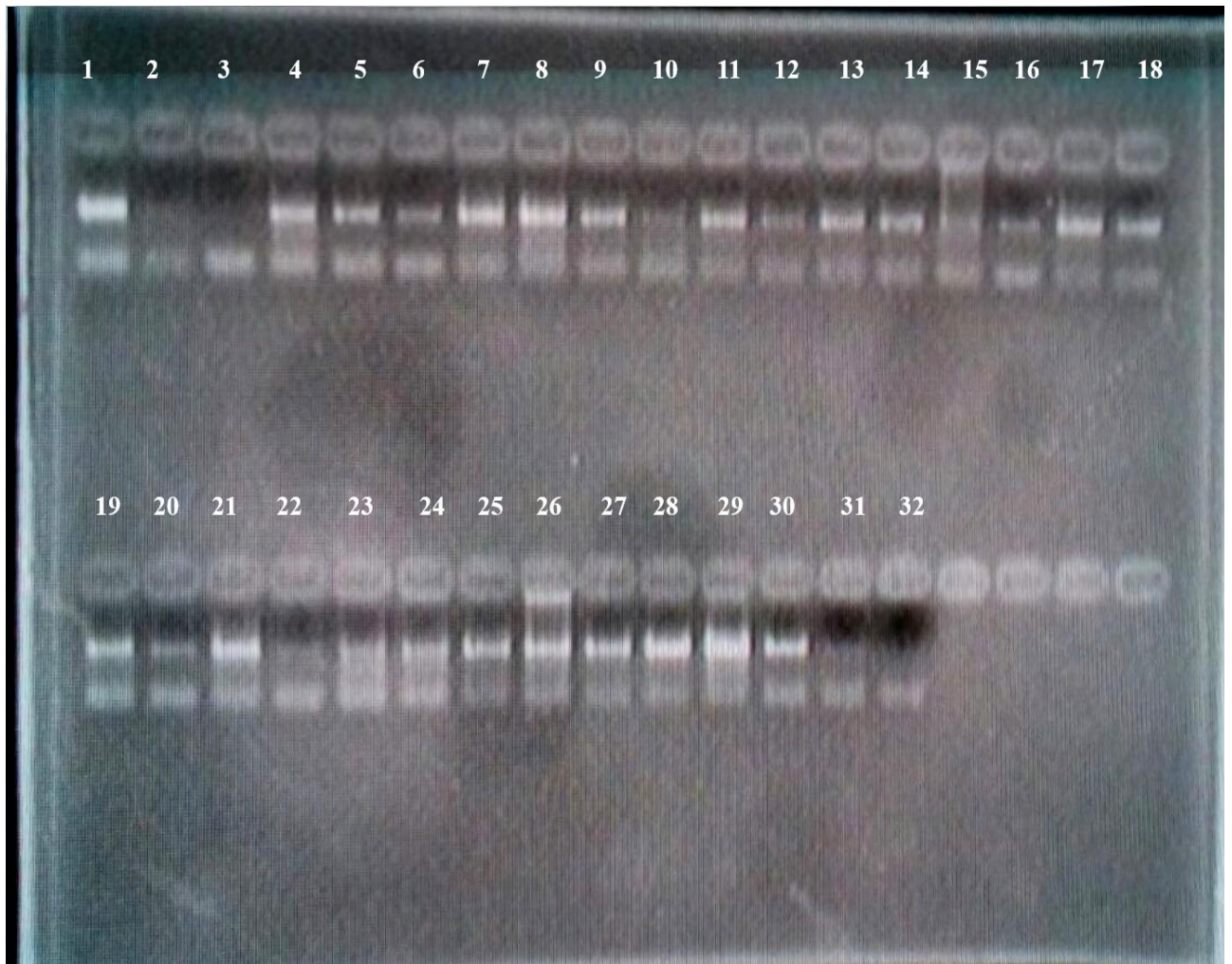


Рисунок 5: Электрофореграмма результатов амплификации ДНК чистой культуры *Streptococcus pyogenes* размером 290пн и ДНК исследуемых образцов: 1 – ДНК чистой культуры *Streptococcus pyogenes*; 1-68– ДНК исследуемых образцов; 30 – отрицательный контроль.

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

3.6 Детекция *Listeria monocytogenes* в клиническом материале методом ПЦР

При исследовании мокроты для обнаружения *Listeria monocytogenes* использовались праймеры ListerF – 4,7 ое/мл.и ListerR 4,6 ое/мл.

По результатам проведенного ПЦР-анализа не было выявлено наличие ДНК *Listeria monocytogenes* ни в одном образце.

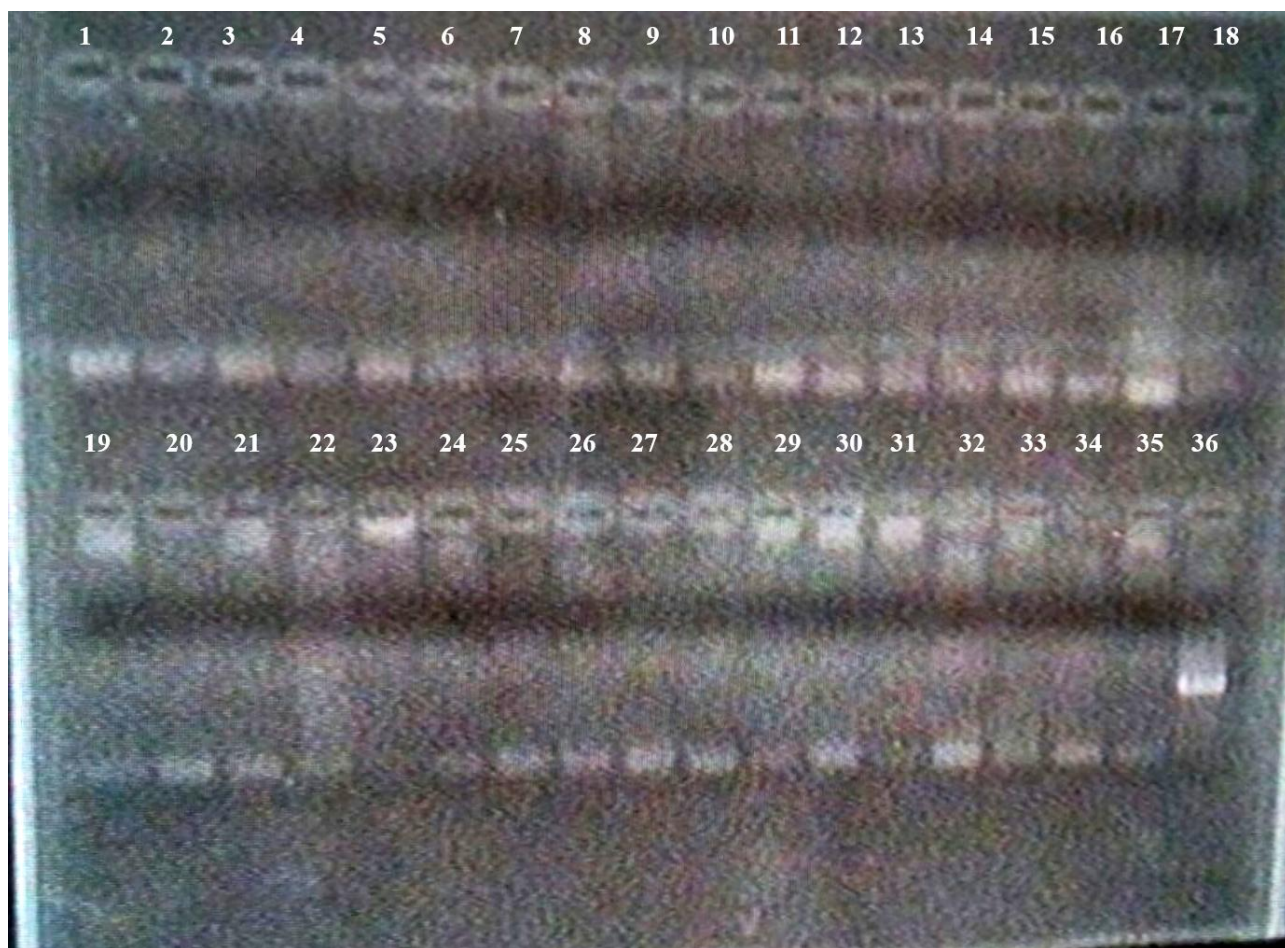


Рисунок 6: Электрофореграмма результатов амплификации ДНК чистой культуры *Listeria monocytogenes* размером 510пн и ДНК исследуемых образцов: 1 – ДНК чистой культуры *Listeria monocytogenes*; 1-36 – ДНК исследуемых образцов; 30 – отрицательный контроль.

Положительными считались пробы, в которых размер продукта соответствовал 510 п.н. Напротив, у отрицательного контрольного образца после проведения ПЦР продукт амплификации не определялся.

3.7 Детекция *Klebsiella pneumoniae* в клиническом материале методом ПЦР

При исследовании мокроты для обнаружения *Klebsiella pneumoniae* использовались праймеры K.pneumF – 20,5 ое/мл. и K.pneumR – 14,2 ое/мл.

По результатам проведенного ПЦР-анализа было выявлено наличие ДНК *Klebsiella pneumoniae* в 20 образцах из 68.

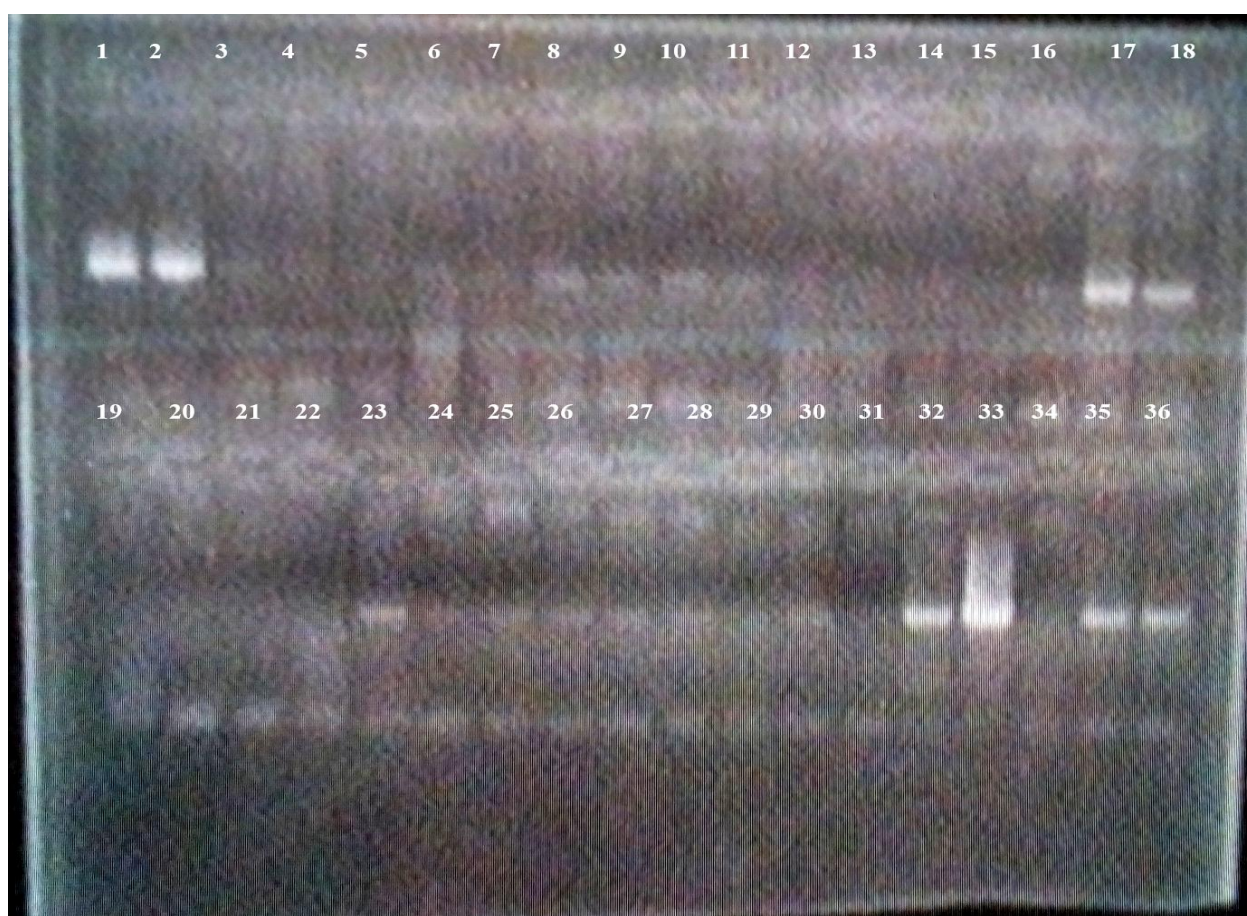


Рисунок 7: Электрофореграмма результатов амплификации ДНК чистой культуры *Klebsiella pneumoniae* размером 290 пн и ДНК исследуемых образцов: 1 – ДНК чистой культуры *Klebsiella pneumoniae*; 1-36 – ДНК исследуемых образцов; 48 – отрицательный контроль.

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

3.8. Анализ полученных результатов

По данным ПЦР – анализа при исследовании мокроты, взятой у 68 больных пульмонологических отделений клинических больниц г. Уфы в зимне- весенний период 2017-2018 года, было выявлено положительные результаты (табл.2)

Таблица 2. Результаты ПЦР – анализа исследуемых образцов

Названия микроорганизмов	кол-во образцов	обнаружено	не обнаружено	обнаружено %
<i>H.influenzae</i>	68	14	54	20,59%
<i>M.cattarhalis</i>	68	20	48	29,41%
<i>P.aeruginosa</i>	68	11	57	16,18%
<i>S.pyogenes</i>	68	39	29	57,35%
<i>S.pneumonia</i>	68	42	26	61,76%
<i>L.monocytogenes</i>	68	0	68	0,00%
<i>K.pneumoniae</i>	68	20	48	29,41%

По результатам исследования у обследуемых больных достоверно чаще обнаруживался *S.pneumoniae*, следует отметить, что у больных ХОБЛ этиологически значимую роль играют также *P.aeruginosa* и *M.catarrhalis* – это необходимо учитывать при назначении этиотропной терапии (рис. 8-11).

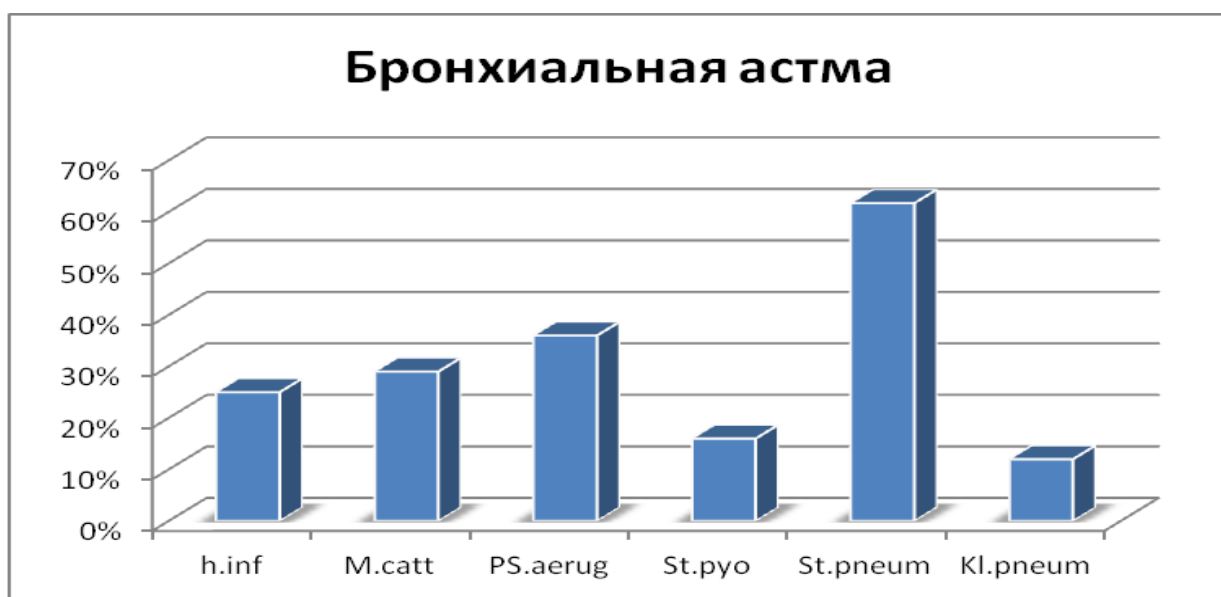


Рисунок 8. Частота встречаемости исследуемых пневмогенов у больных с бронхиальной астмой

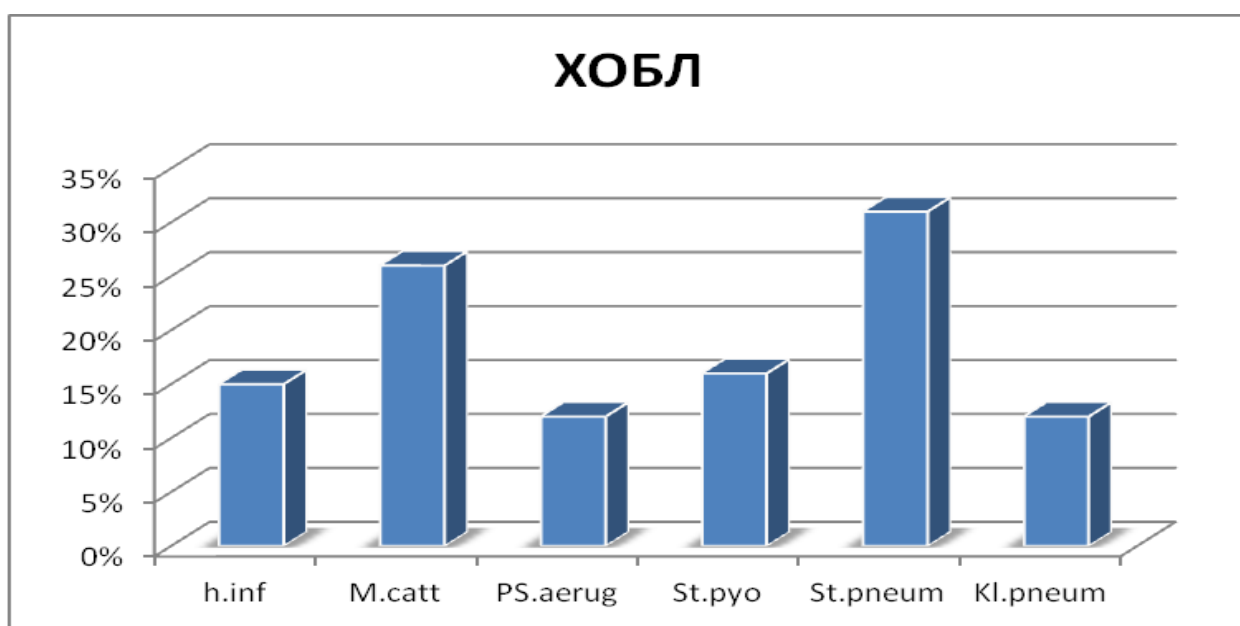


Рисунок 9. Частота встречаемости исследуемых пневмогенов у больных с ХОБЛ

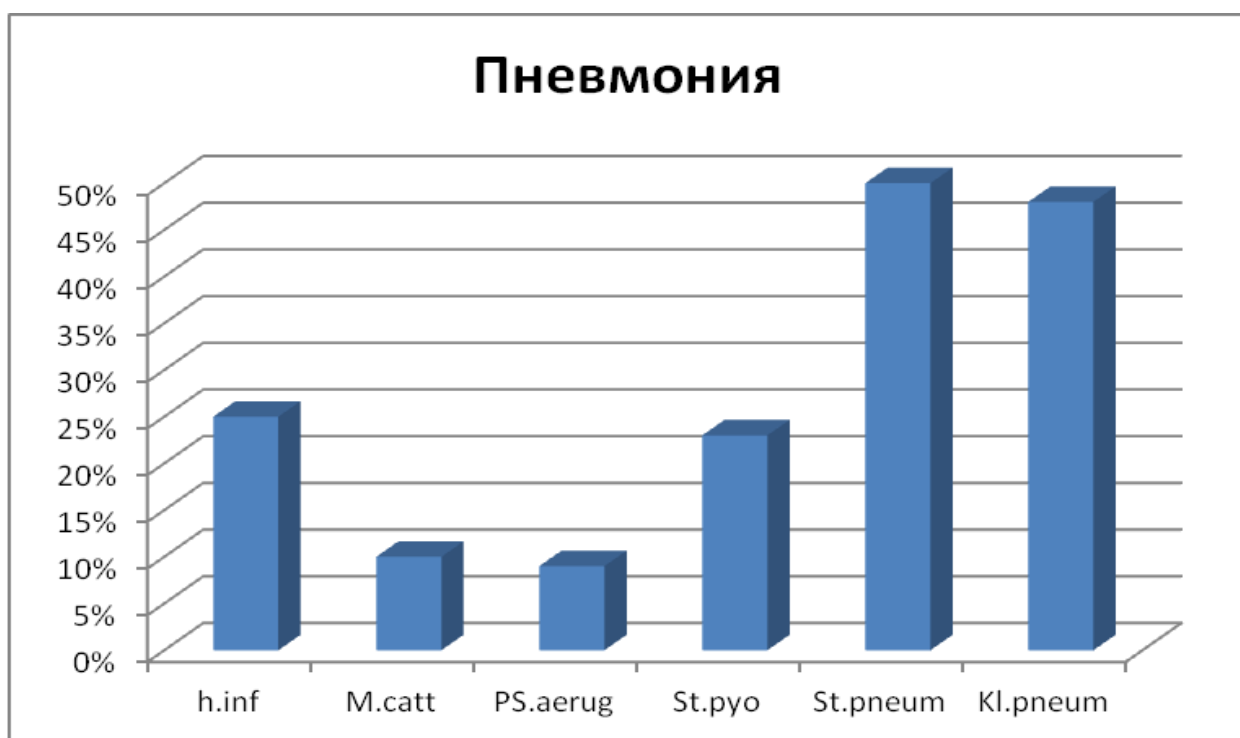


Рисунок 10. Частота встречаемости исследуемых пневмогенов у больных с пневмонией



Рисунок 11. Частота встречаемости исследуемых пневмогенов у больных с пневмонией

В большинстве случаев – 87% в образцах были обнаружены два и более

пневмопатогенов – смешанная микрофлора, у данных больных заболевание протекало в более тяжелой форме, что важно учитывать для своевременной этиотропной терапии.

Выводы

1. Расчет достоверности различий частоты обнаружения видоспецифических фрагментов ДНК (ген 16S рРНК) *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes*, *Hemophilus influenzae* при различных формах патологии органов дыхательной системы показал, что при ПЦР исследовании фрагменты ДНК *Streptococcus pneumonia* обнаруживались в большем проценте в образцах пациентов, чем фрагменты ДНК остальных исследуемых пневмопатогенов.
2. В мокроте больных, где была детектирована два и более пневмопатогенов, заболевание характеризовалось более тяжелым клиническим течением.

Список литературы

1. Краева Л.А.1, Бургасова О.А., Кунилова Е.С., Петрова И.С., Ценева Г.Я.1, Беспалова Г.И. Патогенный потенциал *staphylococcus epidermidis* и *moraxella catarrhalis* при воспалительных процессах верхних дыхательных путей. Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(11): 58–61.
2. Опыт использования методов молекулярной генетики при идентификации клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*.// Кузнецова М.В, Павлов Ю.А., Карпунина Т.И., Демаков В.А./ 2013, 2-5.
3. Особенности течения инфекционного процесса при патологии верхних дыхательных путей. Туровский А.Б., Колбанова И.Г., Кудрявцева Ю.С., Крюков А.И. РМЖ. 2016. Т. 24. № 21.
4. Обзор некоторых основных изменений Ненашева Н. М.GINA. 2014 С. 2-4
5. Внебольничная пневмония: диагностика и дифференциальная диагностика Синопальников А.И/ практическая пульмонология // 2003
6. Бургасова О.А., Краева Л.А., Петрова И.С. Оценка роли микроорганизмов респираторного тракта у больных с осложнением течением острых респираторных вирусных инфекций. 2014
7. Викина Д.С, Тец Г.В, Вечерковская М.Ф, Доморад А.А, Харламова В.В, Тец В.В,— Возбудители пневмонии как возможные неизвестные условно-патогенные бактерии представители микрофлоры челока, 2013.
8. Бисенова Н.М., Митус Н.М., Тулеубаева Э.А. и др. Оценка бактериального спектра мокроты больных с пневмонией и обострением ХОБЛ// Лабораторная диагностика. – 2011. - №1. – С.56-58
9. [Патологическая анатомия хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астмы: сходства и различия. Черняев А. Л., Самсонова М. В. 2013]

10. Особенности течения инфекционного процесса при патологии верхних дыхательных путей
Туровский А.Б., Колбанова И.Г., Кудрявцева Ю.С. Крюков А.И.
РМЖ. 2016 С. 2-3
11. Патологическая анатомия пневмонии / Черняев А.Л. Самсонова М.В. // Пульмонология. - 2013. С. 1-2.]
12. Сергеева, Е. В. Хроническая обструктивная болезнь лёгких / Е. В. Сергеева, Н. А. Черкасова; под ред. Л. И. Дворецкого. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 72 с.
13. Адаптационные возможности клинических изоляторов *Pseudomonas aeruginosa* // Косякова К.Г.// 2013.
14. Викина Д.С., Тец Г.В., Вечерковская М.Ф., Доморад А.А., Харламова В.В., Тец В.В., — возбудители пневмонии как возможные неизвестные условно-патогенные бактерии представители микрофлоры человека , 2013
15. Внебольничная пневмония у больных хронической обструктивной болезнью легких/
Дворецкий Л.И. Практическая пульмонология. 2015. № 2. С. 17-24.
16. Зверев В.В., Бойченко М.Н. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / под ред. Зверева В.В., Бойченко М.Н. - М., 2010. – 480 с.
17. Лабинская, А.С. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций / А.С. Лабинская, Н.Н. Костюкова, С.М. Иванова. - М.: Бином, 2010. – 1115 с.
18. Sun HY, Fujitani S, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*. 2011 Apr;139(4):909-19.

19. Роль изучения факторов местного иммунитета при патологии дыхательных путей Совалкин В.И., Алтынова Е.И., Нестерова К.И., Ломброзо А.В. Фундаментальные исследования. 2011. № 10-1. С. 151-154.
20. Мониторинг степени влияния патологии верхних дыхательных путей на качество жизни Арустамян И.Г., Сопко О.Н. Российская оториноларингология. 2013. № 1 (62). С. 21-25.
21. Брюханов, А.Л. Учебник для вузов / А.Л. Брюханов, К.В. Рыбак, А.И. Петрусов. Молекулярная микробиология: - М.: МГУ, 2012. – 48
22. *Pseudomonas aeruginosa*: Патогенность и патогенез патологии.// Крыжановская О.А., Чеботарь И.В., Чеботарь В.И., Лазарева А.В., Маянский Н.Ф.//2015
23. Питательные среды для *Pseudomonas aeruginosa*, определение специфической активности/ Шепелин А.П., Сергеева А.Б., Полосенко О.В., 2017
24. Волков И.К., Катосова Л.К., Щербакова Н.Ю., Клюкина Л.П. *Moraxella catarrhalis* при хронических и рецидивирующих заболеваниях органов дыхания // Антибиотики и химиотерапия. — 2004. — Т. 49, № 8–9. — С. 43–47.
25. *Haemophilus influenzae* GILSDORF J.R.//2009
26. Использование внешних и внутренних контрольных образцов при постановке полимеразной цепной реакции и обратной транскрипции полимеразной цепной реакции / Сизикова Т.Е., Мельникова Е.В., Маношкин А.В., Петров А.А., Мельников Д.Г., Пантюхов В.Б., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Клиническая лабораторная диагностика // 2013.

27. Об особенностях применения критерия согласия пирсона χ^2 .
Экономические и социально-гуманитарные исследования, Гафарова Л.М.,
Завьялова И.Г., Мустафин Н.Н.// 2015.
28. Автоматизированный расчет критерия пирсона (математическая
статистика без статистических таблиц), Текст научной статьи по
специальности «Общие и комплексные проблемы естественных и точных
наук», Шашков В.Б.// 2005.
29. Streptococcus pyogenes: характеристика микроорганизма, идентификация
и определение чувствительности к антибактериальным препаратам, выде-
ление. О.И. Кречикова, К.В. Шпынев, В.А. Кречиков, Р.С. Козлов. –
Том 9– No2– 2009– С. 88-98.
30. Streptococcus pneumoniae молекулярное типирование методом
мультиплексной с учетом распространенности в Российской
//Алябьева Н.М, Блинова Т.А., Пономаренко О.А., Лазарева А.В., Катосов
а Л.К., Маянский Н.А.//2013
31. Чувствительность Streptococcus pneumoniae, выделенных из мокроты
больных с обострением хобл, Бисенова Н.М., Ергалиева А.С.// 2013
32. Хроническая обструктивная болезнь легких: воспаление как ключевая
проблема, Визель А.А, Визель И.Ю. 2013
33. Белобородов В.Б. Антибактериальная терапия инвазивной пневмококково
й инфекции и проблема резистентности пневмококков // Инф. и антимикр
. терапия. 2006. No6. С.168-172.
34. Козлов Р.С. Пневмококки: уроки прошлого -взгляд в будущее. Смоленск:
МАКМАХ, 2010. 128с.
35. Выделение, идентификация и определение чувствительности к
антибиотикам Haemophilus influenzae (Метод. рекомендации для
микробиологов) // Клин. микробиол. антимикроб. химиотерапия. – 2000. –
№ 2 – Т. 2. – С. 93-109.

36. Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Савченко А.А. Микробиоценоз слизистой оболочки носа и риносинуситы// Красноярск: КрасГМУ, 2011. - 180 с.
37. Д.А. Васильев., А.А. Щербаков., Л.В. Карпунина., С.Н. Золотухин//Методы частной бактериологии//Учебно-методическое пособие//Ульяновск – 2004 г., с - 224
38. Методические рекомендации для микробиологов// Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.//Том 2, N 1, 2000 стр. 88-98;
39. Пульмонология: клинические рекомендации / под ред. А.Г. Чучалина. – М.: ГЭОТАР - Медиа, 2011. – 336 с.
40. Д. И. Трухан, И.А. Викторова. Внутренние болезни. Болезни органов дыхания. Учебное пособие// Санкт-Петербург – 2013
41. Hurst J.R. Upper airway. 3: Sinonasal involvement in chronic obstructive pulmonary disease // Thorax. — 2010. — Vol. 65, № 1. — P. 85-90.
42. Прошлое и настоящее *Streptococcus pyogenes*: некоторые факторы патогенности и их генетическое детерминирование // Тотолян А.А.// 2015
43. Получение различных типов антигенов *listeria monocytogenes* для иммуноферментного анализа Васильев Д.А., Хлынов Д.Н.// 2011
44. Обзор биофизических особенностей микробной адгезии //Серегина Н.В., Честнова Т.В., Жеребцова В.А., Хромушин В.А.//2008

ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Султангильдина Миляуша Фаридовна выполнила выпускную квалификационную работы на тему: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ.

Студентка Султангильдина М.Ф. проходила квалификационную практику в Башкирском государственном медицинском университете на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии. В ходе прохождения практики Султангильдина М.Ф. проработала значительный объем научной и методической литературы, освоила метод полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в агарозном геле с помощью электрофореза. Прделанная ей работа позволила оценить этиологическую значимость исследуемых пневмопатогенов при различной патологии органов дыхания.

За время обучения в БГМУ Султангильдина М.Ф. показала себя ответственной и исполнительской студенткой.

В процессе выполнения выпускной квалификационной работы Султангильдина М.Ф. освоила основные молекулярно-биологические и микробиологические методы исследований, хорошо ориентируется по современным биологическим базам данных и имеет достаточную теоретическую подготовку.

Выпускная квалификационная работа Султангильдиной М.Ф. допускается к защите заслуживает положительной оценки.

Научный руководитель:
к.м.н., доцент кафедры
фундаментальной и прикладной
микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России



Мирсаяпова И.А.

ОТЗЫВ

внешнего рецензента доктора биологических наук Хаматдиновой Земфиры Робертовны на выпускную квалификационную работу Султангильдиной Миляуши Фаридовны

«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ».

Актуальность темы исследования. Инфекционные заболевания органов дыхания – одна из актуальных проблем современного здравоохранения является наиболее частой причиной обращения за медицинской помощью в РФ и во всем мире. Спектр этиологически значимых агентов при инфекционных поражениях дыхательных путей чрезвычайно широк. Истинная частота встречаемости и видовой состав пневмопатогенов может существенно отличаться от приведенных литературных данных, поскольку для лабораторного их выявления и идентификации используются методы, информативность которых в зависимости от вида бактерий, исследуемого материала, фазы заболевания и т.д., может варьировать в очень широких пределах. В связи с этим цель данного исследования явилась оценка частоты встречаемости *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* при различных формах патологии органов дыхательной системы человека молекулярно-генетическим методом.

Достоверность и апробация результатов исследования. В качестве материала исследования использовали мокроту от пациентов с различной легочной патологией (внебольничная пневмония, ХОБЛ, бронхит, бронхиальная астма), находившихся на стационарном лечении, которую исследовали с помощью полимеразной цепной реакцией на обнаружение ДНК пневмопатогенов: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* с использованием подобранных ранее праймеров к специфическим консервативным последовательностям ДНК микроорганизмов – к генам 16 S рРНК. В последующем проводили обработку полученных данных.

Теоретическая и практическая значимость работы. Дана оценка частоты встречаемости *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* при различных формах легочной патологии человека, а именно при бронхите, бронхиальной астме, хронической обструктивной болезни легких, внебольничной пневмонии. Полученные данные информируют о распространенности исследуемых пневмопатогенов, их роли в развитии заболеваний дыхательных путей и их этиологической значимости в развитии осложнений легочных патологий. Полученные данные могут быть использованы при санитарно-эпидемиологическом мониторинге и анализе частоты встречаемости.

Оценка содержания, завершенности и оформления ВКР. Работа изложена в традиционной форме. Включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и список использованной литературы. Оформление соответствует требованиям ГОСТ Р 7.0.11-2011.

Заключение. Таким образом, выпускная квалификационная работа Султангильдиной Миляуши Фаридовны, выполненная под руководством кандидата медицинских наук, Мирсаяповой И.А., является завершенной и соответствует требованиям ФГОС ВО (приказ Минобрнауки РФ №944 от 07.08.2014 г.) по направлению подготовки 06.03.01. – Биология (бакалавриат).

Доктор биологических наук, заведующей иммунологической лабораторией с отделением клинической лабораторной диагностики, ГБУЗ «Республиканской детской клинической больницы (Адрес: г. Уфа, ул. К. Маркса 98. Тел.: (347) 2290839; E-mail: imun-lab@mail.ru)



Хаматдинова Земфира Робертовна



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	Султангильдина Миллуша Фаридовна
Факультет, кафедра, номер группы	Б - 401А
Тип работы	Дипломная работа
Название работы	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ
Название файла	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ.doc
Процент заимствования	6,71%
Процент цитирования	20,02%
Процент оригинальности	73,28%
Дата проверки	15:16:57 26 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	27.06.2018.

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



ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

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

Султангильдина М.Ф.
Подпись проверяющего