

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



Кудряшова Кристина Евгеньевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИЙ
РОДА *SAMPYLOBACTER* В БИОПТАТАХ
ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА**

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор



А.Р.Мавзютов

Научный консультант:
Старший лаборант

Л.О.Бижбалова

Уфа – 2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Микрофлора кишечника	6
1.2. Нарушение микрофлоры кишечника у больных	8
1.3. Общие представления о <i>Campylobacter spp.</i>	10
1.4. Роль бактерий рода <i>Campylobacter</i> при воспалительных заболеваниях кишечника	13
1.5. Эпидемиология	15
1.6. Индикаторы патологического процесса при заболеваниях кишечника	15
1.7. Клинико-лабораторные методы исследований	17
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Диагностика <i>Campylobacter spp.</i> у больных ВЗК	21
2.2. Выделение ДНК из клинического материала	21
2.3. Амплификация участков ДНК методом полимеразной цепной реакции	23
2.4. Анализ электрофореграммы ДНК	27
2.5. Выделение ДНК с использованием магнитных частиц	28
2.6. Проведение Real-time PCR	29
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1. Выделение ДНК с помощью комплекта "ДНК-сорб-С"	32
3.2. Выделение ДНК с помощью магнитных частиц	33
3.3. Подбор оптимальных условий для амплификации участков ДНК	34
3.4. Полученные результаты исследования классической ПЦР	35
3.5. Полученные результаты исследования Real-time PCR	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	39
ВЫВОДЫ	40
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	41

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БК – болезнь Крона

НЯК – неспецифический язвенный колит

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ВЗК – воспалительное заболевание кишечника

СО – слизистая оболочка

СРК - синдром раздраженного кишечника

ОКИ – острая кишечная инфекция

Аг – антиген

РА – реакция агглютинации

РСК – реакция связывания комплимента

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

НК – нуклеиновая кислота

ПК – положительный контроль

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РТ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

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

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Одной из наиболее серьезных и нерешенных проблем в современной гастроэнтерологии и колопроктологии является Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), к которым относятся Язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК).

ВЗК представляют собой хронический воспалительный процесс, который затрагивает весь кишечник или часть желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Это приводит к болям в животе, диарее, нарушению всасывания в кишечнике.

Несмотря на то, что они уступают другим гастроэнтерологическим заболеваниям, они занимают одно из ведущих мест по тяжести течения, частоте осложнений и летальности в структуре болезней желудочно-кишечного тракта (Визе-Хрипунова, 2014).

По данным ВОЗ распространенность ВЗК колеблется в широких пределах, таким образом, для язвенного колита она составляет 30-270 случаев, а для болезни Крона 30-200 случаев на сто тысяч населения. Ежегодный прирост ЯК составляет 5-20 случаев на сто тысяч, тогда как ежегодный прирост БК составляет 3-7 случаев на сто тысяч. Смертность от воспаления кишечника, в том числе от болезни Крона и неспецифического язвенного колита, составляет примерно 1 млн. населения. В России чаще всего диагноз ставится несколько лет от момента появления первых симптомов данного заболевания.

Хотя точная этиология заболевания до сих пор не ясна (Полужктова, 2014), считается, что в его основе лежит воспаление преимущественно аутоиммунного характера и так же активное действие различных бактериальных агентов (Дорофеев, 2014). К ним относятся антигены бактерии рода *Campylobacter*, которые имеют сродство с тканями слизистой оболочки тонкой и толстой кишки.

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

Сочетание заболевания с различными проявлениями других симптомов вызывает разного рода трудности в его диагностике на начальных стадиях. С момента возникновения первой симптоматики до установления точного диагноза может пройти несколько месяцев и в редких случаях лет. (Langan, 2007).

Задачи исследования:

1. Сбор клинического материала (парафиновые блоки);
2. Депарафинизация биоптатов;
3. Выделение бактериальной ДНК из клинического материала больных;
4. ПЦР анализ образцов ДНК, выделенных из клинического материала больных;

Материалы и методы:

1. Выделение ДНК из биоптатов;
2. Амплификация участков ДНК методом полимеразной цепной реакции;
3. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле;
4. Амплификация участков ДНК методом ПЦР;
5. Проведение ПЦР в режиме реального времени;

Цель работы. Разработка способа выделения ДНК из биоптатов для молекулярно-генетической детекции бактерий рода *Campylobacter spp.* и диагностики воспалительных заболеваний кишечника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Микрофлора кишечника

Желудочно-кишечный тракт является не только органом пищеварения, но и одним из самых важных органов пищеварения. На работу ЖКТ влияют многие факторы, такие как антигены внешней среды, разнообразная пища. Так же имеет важное значение значительная площадь контакта с бактериями, паразитами и вирусами, которые вызывают защитные реакции устремленные на микроорганизмы и неорганические вещества (Александров, 2006).

Кишечник один из важнейших органов иммунной системы человека, его слизистая складывается из иммунологически активной ткани, которой в свою очередь обнаруживается до 80% иммунокомпетентных клеток (Александров, 2006).

Нормальная микрофлора кишечника состоит из большого количества бактерий, от отдельных видов до целых штаммов, именно это и формирует колонизационную резистентность организма к кишечным инфекциям. Колонизационная резистентность в данный момент принадлежит к факторам не специфической защиты. Общая масса микроорганизмов в детском возрасте составляет 1-1,5 кг, у взрослых до 3-4 кг, что составляет 50-60% сухого остатка кала. В кишечнике человека насчитывается более пятисот видов бактерий, именно это- одна из особенностей микрофлоры кишечника. А численность бактерий равна тысячи, из бактерий состоит биопленка, которая покрывает все слизистые и кожу человека (Мечников, 1907).

Особые сигналы для иммунной системы подаются микрофлорой кишечника, кроме того контролируется такая важная функция как гомеостаз кишечника.

Опытным путем доказано, что для полноценного развития кишечника человека необходимо влияние не только антигенов пищи, но и что самое важное, антигенов нормофлоры.

Иммуноглобулин -IgA производится местно плазматическими клетками кишечника, которые находятся в собственной пластинке кишечника. Он является одним из самых важных аспектов иммунитета. Во-первых: IgA побуждает активность лимфоцитов и фагоцитов против патогенных бактерий. Во-вторых: не допускает прикрепления вирусов и бактерий к слизистым оболочкам связывая их антигены (нейтрализация вирусов и агглютинация бактерий). В-третьих: защищает организм от аллергических реакций связывая пищевые антигены и аллергены (Александров, 2006; Урсова, 2006; Щеплягина, 2008).

Для диагностики дизбактериоза определяют количество бифидобактерий и концентрацию иммуноглобулинов класса А в фекалиях человека. Этот метод эффективен в своем использовании и позволяет нам увидеть полную картину происходящего. Учитывая эффективность метода определения концентрации иммуноглобулинов, метод стали использовать повсеместно.

Повреждение функций нормофлоры и уменьшение иммунного статуса кишечника вызваны продолжительными хроническими процессами ЖКТ, которые нарушают микрoэкологический баланс подавляя колонизационную резистентность. Патологии ЖКТ имеют определенную цикличность течения процесса. Очень важно предвидеть начало обострения заболевания и продлить ремиссию. Благодаря восстановлению иммунной функции нормального биоценоза и флоры, путем результативной коррекции нарушенного микробиоценоза, можно продлить ремиссию. Поиск новых способов лечения хронических заболеваний кишечника у людей, гарантирующих одновременно устранение абдоминального синдрома, это восстановление системы пищеварения, местного иммунитета и общий иммуномодулирующий статус является одним из самых важных на сегодняшний день.

ВЗК характеризуются неспецифическим иммунным воспалением стенки кишечника — поверхностным при ЯК и острым при БК. Язвенный

колит — хроническое заболевание, характеризующееся диффузным воспалением, находящееся в пределах слизистой оболочки (СО), воздействует только на толстую кишку на разном протяжении, в то время как при болезни Крона, повреждаются разные органы пищеварительного тракта — от полости рта до анального канала (Travis, 2010).

Частота нарушений нормофлоры при воспалительных заболеваниях кишечника достигает от 66 до 93% (Халиф, 2004).

При заболевании ВЗК у больных наблюдается потеря иммунологического восприятия к бактериям, населяющим весь желудочно-кишечный тракт (Biancone, 2002; Воробьев, 2008).

Нарушение нормальной микрофлоры тонкой кишки при болезни Крона и толстой кишки при БК и ЯК из-за недостаточности илеоцекального клапана, снижения местного иммунного статуса, который выражается в виде снижения содержания иммуноглобулинов класса А в соке тонкого кишечника, имеет большое значение в развитии чрезмерного бактериального роста в тонкой кишке- это и дает объяснение колонизации тонкой кишки аэробной условно-патогенной микрофлорой или облигатными анаэробами. При ВЗК нарушается множество реакций такие как: сохранение и постоянство внутренней среды кишечника, чистка межклеточного пространства методом аутофагии от различных микроорганизмов. К хроническому воспалению слизистой оболочки кишечника приводит критическое изменение соотношения числа видов микрофлоры и генетическое детерминирование, нарушение барьерной функции эпителиальных клеток (Wehkampetal., 2007).

1.2. Нарушение микрофлоры кишечника у больных

Микробиоценоз – эволюционно сложившаяся экологическая система, выражающая собой совокупность микроорганизмов, обитающих в конкретном биотопе. Качественный и количественный состав

микроорганизмов относительно стабилен для определенного биотопа, но при этом видовой состав микроорганизмов зависит от влияния факторов внешней среды, характера питания, возраста, времени года и уровня гигиены (Ланкина, 2002; Григорьян и др., 2005).

Данные об участии микроорганизмов в ВЗК за последние годы увеличились во много раз. Изменение микрофлоры или «дисбактериоз» является одним из ключевых факторов в длительном течении воспалительного процесса в ВЗК. Множественные исследования генома обнаружили дополнительные гены, которые учувствуют в формировании врожденного иммунитета, в том числе полиморфизмов в генах, принимающих участие в аутофагии: ATG16L1 и IGRM. Исследование генома также дали толчок к поиску конкретных патогенов, которые могут представлять определенное влияние на метаморфоз кишечника.

Воспалительные заболевания кишечника имеют две составляющие: язвенный колит и болезнь Крона, характеризующиеся хроническим воспалением, проявляющимися в кишечнике у генетически предрасположенных лиц, и подвергается воздействию определенных экологических факторов. ВЗК исторически считается «западной» болезнью, а в последнее десятилетие наблюдается её увеличение во всём мире. Интерес к данной области был связан с появлением культурально независимых методов, таких как секвенирование и метагеномика, которые являются гораздо более точными и сложным. В настоящее время выросло понимание людей участия микрофлоры кишечника при ВЗК (Zoetendal, Rajilic-Stojanovic, 2008; Weinstock, 2012).

До этих кардинальных научно-технических разработок основное внимание было сосредоточено на изучении патогенов среди огромного множества микроорганизмов в просвете кишечника, которые могли нести ответственность за инициирование воспалительных процессов, характерных для ВЗК (Prantera, Scribano, 1999). Находки в последнее десятилетие

перевернули всю эту концепцию, показывая, что кишечная микрофлора изменяется при ВЗК.

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

Множество известных патогенных бактерий в организме человека принадлежат к роду *Campylobacter spp.*, которые играют ключевую роль в ВЗК. Микробиологический анализ показал, что они являются побудителями хронического воспаления кишечника у пациентов.

1.3. Общие представления о *Campylobacter spp.*

Заболевания ЖКТ животных и человека связанные с бактериями рода *Campylobacter spp.* чаще всего вызывают ВЗК. Такие болезнетворные бактерии для человека, как *Campylobacter jejuni* и *Campylobacter coli* хорошо известны как болезнетворные бактерии, они связаны с рядом клинических состояний, таких как диарея, сепсис и синдром Гийена-Барре (Moore et al., 2005).

Есть и другие виды *Campylobacter spp.*, например *Campylobacter concisus* которые рассматриваются в качестве новых патогенов человека. *C. Concisus* представляет собой изогнутые грамотрицательные бактерии, имеющие один полярный жгутик (Vandamme, 2005). *C. concisus* был впервые выделен Таннером в 1981г. В дальнейших исследованиях Macuch и Таннер сообщили о более высокой скорости изоляции *C. concisus* особенно у больных на начальной стадии пародонтита, по сравнению с людьми, имеющих здоровые десны (Macuch, 2000).

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

Возбудитель попадает в организм через ротовую полость, а затем в ЖКТ при несоблюдении правил личной гигиены, алиментарным путём. Инфицирующая доза составляет приблизительно 10⁵ бактерий, но доза может быть во много раз ниже для больных со сниженным иммунным статусом. Но для лиц со сниженным иммунным статусом эта доза во много раз ниже. Бактерии вида *Campylobacter spp.* имеют большой набор факторов патогенности: способны к адгезии, инвазии и продуцированию токсинов. Данный возбудитель имеет широкий спектр клинических проявлений.

Бактерии, которые смогли пройти через кислую среду желудка, внедряются в слизистую оболочку тонкой кишки и ее лимфоидные образования. А так же выявлена способность *Campylobacter spp.* проникать в собственную пластинку слизистой оболочки в составе фагосомо-подобных

вакуолей через эпителиальную клетку и при помощи прямого межэпителиального проникновения. Благодаря сканирующей микроскопии выяснили, что вначале бактерии с помощью жгутиков прикрепляются к эпителиальным клеткам, которые затем перфорируют клеточную мембрану. *Campylobacter spp.* также имеют молекулы адгезинов помимо жгутиков, находящихся на поверхности самих бактерий, которые способны усиливать связь с энтероцитами (Иванов, 1995).

Кроме фактора адгезии в патогенезе кампилобактериоза важное место имеет инвазивная активность возбудителей, которые в свою очередь легко проникают через наружную мембрану эпителиальных клеток или через межклеточные промежутки эпителия. Эндотоксины вызывает различные реакции на весь организм: лихорадку, рвоту, боли в животе, неспецифическую активацию клеток иммунной системы в виде синтеза и широкого спектра цитокинов, внутрисосудистого свертывания крови и многое другое. Так же *Campylobacter spp.* продуцируют энтеротоксины, которые сходны по строению к холерному токсину и термолабильному токсину *E.coli*, а также содержат несколько цитотоксинов: гемолизин, шигаподобный токсин, цитолетальный «взрывной» токсин. На месте входных ворот инфекция развивает воспалительный процесс различной степени тяжести. По лимфатическим сосудам *Campylobacter spp.* попадают в мезентеральные лимфоузлы, в результате чего возникает мезаденит, в патологический процесс может внедряться в червеобразный отросток (Иванов, 1995; Wassenaar, 1997; Butzler, 2000; Tenkate, 2001).

Одну из важных ролей в возникновении аутоиммунной патологии при кампилобактериозе, а именно поражения периферической нервной системы, играют поверхностные липополисахариды клеточной стенки *C. jejuni*, данные молекулы обладают структурой, аналогичной структуре ганглиозидов (GM1, GD1a и GQ1b) плазматической мембраны синапсов, в результате выработки аутоантител к ним блокируется синаптическая передача импульса в терминалях моторных нейронов. Развитию аутоиммунных состояний после

перенесенной кампилобактериозной инфекции способствует генетическая предрасположенность, ассоциированная с HLA B35, HLA DQB1*03, HLA DR3 генами при поражении нервной системы и HLA B27 при возникновении артритов (YukiN., 1999; Tam, 2003).

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

1.4. Роль бактерий рода *Campylobacter* при воспалительных заболеваниях кишечника.

Воспалительные заболевания кишечника представляют собой хронический воспалительный процесс, захватывающий весь кишечник или часть желудочно-кишечного тракта. Обычно это приводит к болям в животе и диарее. Причины данной патологии до сих пор точно неизвестны, хотя предполагается участие иммунной системы, генетических факторов и некоторых видов микроорганизмов.

В последнее время большое внимание специалистов направленно на изучение ВЗК, форма, которой зависит от патогенетических взаимодействий бактерий.

Слизь и кровь, находящиеся в фекалиях больных подтверждает инвазивность *Campylobacter spp.*, а также воспалительные изменения и отек слизистой оболочки кишечника у больных с диарейным синдромом.

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 (Шкурко, 2016)

При попадании *Campylobacter spp.* в кишечник у человека начинает остро проявляться лихорадка, симптомы общей интоксикации и синдром гастроэнтерита. Больных беспокоят тошнота, рвота, боли в эпигастральной области (Коновалова, 2004).

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

Campylobacter род спирально извитых аспорогенных бескапсульных подвижных грамм отрицательных хемоорганотрофных микроаэрофильных или анаэробных бактерий из сем. *Spirillaceae*. Размеры бактерии 0,2 - 0,5x0,5 - 8 мкм, тело имеет один спиральный завиток или более, по жгутику на одном или обоих полюсах. Движение бактерий быстрое, винтообразное.

Бактерии рода *Campylobacter* достаточно быстро и легко погибают в окружающей среде из-за её воздействий (большое содержание кислорода, высушивание, температура, ультрафиолет, воздействие дезинфицирующих средств, кислая среда и т.п.). Растут на питательных средах при сниженной концентрации кислорода, 37 -43°C, pH 7, образуя каплеобразные колонии.

1.5. Эпидемиология

Резервуаром и источником инфекции *Campylobacter spp.* являются преимущественно сельскохозяйственные животные.

Человек заражается алиментарным путем, фекально-оральный механизм при употреблении продуктов и воды, загрязненных выделениями (Коновалова, 2004).

Передача инфекции может происходить водным путем. А так же обнаружены случаи инфицирования *Campylobacter spp.* при контакте с больными животными, которые страдают диарейным синдромом. У беременных возможна трансплацентарная передача инфекции.

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

Повышенному риску инфицирования *Campylobacter spp.* подвергаются лица, которые имеют профессиональный контакт с сельскохозяйственными животными. Люди с ослабленным иммунитетом имеют большую восприимчивость к кампилобактериозу, а также страдающие алкоголизмом, сердечнососудистыми заболеваниями, сахарным диабетом, злокачественными новообразованиями, после гастрэктомии и прохождения лечения иммунодепрессантами. Постинфекционный иммунитет мало изучен.

1.6. Индикаторы патологического процесса при заболеваниях кишечника

Одной из самых сложных проблем в гастроэнтерологии остаётся лечение НЯК и БК (Белоусова, 1998). Для установления этих заболеваний используются эндоскопические, рентгенологические и морфологические методы исследования. Между тем они имеют определенные недостатки: инвазивность, лучевую нагрузку, введение в организм пациента контрастных вещества, имеется множество противопоказаний.

Течение заболеваний происходит со сменами периодов ремиссии и рецидивов. Обострения при ВЗК могут изменяться, часто симптомы заболевания возникают в разное время от начала обострения. По этой причине пациенты обращаются за помощью в медицинские учреждения не в момент начала болезни, что приводит к более интенсивному и длительному лечению до наступления ремиссии. Своевременное предвидение начала обострения помогло бы оптимизировать терапию и снизить оказываемый вред поддерживающей терапии тем, чей риск наступления обострения ниже.

На данный момент лучшим способом оценки активности воспалительных заболеваний кишечника является эндоскопическое исследование с биопсией слизистой оболочки толстой кишки, которая позволяет видеть наглядно желудочно-кишечный тракт и получить материал для дальнейшего гистологического исследования. Однако, данная методика инвазивна, не дает возможности исследовать весь желудочно-кишечный тракт по всей длине и требует специальной подготовки специалиста. Усовершенствование эндоскопических методик привело к появлению видеокапсульной эндоскопии. Однако данный способ дорогостоящий и считается недоступным, а также отсутствует возможность получения образцов ткани для гистологического анализа. Именно инвазивный характер этих методов считается препятствием для проведения диагностических процедур в каждом случае, когда это необходимо для оценки активности заболевания.

По этой причине возник острый вопрос о проблеме поиска действенного, неинвазивного и недорогого маркера активности кишечного воспаления, который можно было бы использовать в повседневной клинической практике, особенно остро стоит данная проблема в педиатрии.

1.7. Клинико-лабораторные методы исследований

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

После транспортировки, как правило, изготавливают мазки из полученного материала (кровь, спинномозговая жидкость, фекалии и рвотные массы), а затем окрашивают по Граму. При наличии в пробе патогенных *Campylobacter spp.* в мазке наблюдают возбудители имеют вид тонких, изогнутых, чаще спиралевидных клеток, могут иметь один и более витков и достигать в длину до 8 мкм. У культур, которые выращивали в течение 72 ч и дольше, клетки могут приобретать кокоподобной формы, что может привести к ошибкам в идентификации. Для быстрого обнаружения кишечного патогенного кампилобактериоза, тонкий мазок кишечника фиксируют над пламенем горелки 15 секунд, затем окрашивают водным раствором основного фуксина и промывают водой. Так как за такое короткое время большая часть, присутствующая в мазке сопутствующей микрофлоры прокраситься не успевает, *Campylobacter spp.* можно легко идентифицировать по особенностям строения.

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

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

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

После 2-4 суток инкубации, на плотных питательных средах вырастают колонии двух типов. На свежих питательных средах вырастут колонии плоские, влажные, блестящие, с тенденцией к ползучему росту, напоминающие растекающиеся капли конденсата. Если снизить влажность питательных сред в процессе хранения на плотных средах вырастут колонии второго типа: более плотные, выпуклые, полупрозрачные, негемолитические, диаметром 1-2 мм, трудно отличимые от колоний, контаминирующей микрофлоры. При наличии достаточного количества чистой культуры возбудителя готовят мазки и окрашивают их по Граму, определяют подвижность микроорганизмов методом «раздавленной» капли, ставят тесты на каталазу, оксидазу, гидролиз гипсурата натрия и определяют

чувствительность к налидиксовой кислоте. При наличии небольшого количества колоний кампилобактеров изолированную колонию с характерными культуральными свойствами пересевают для накопления на плотную питательную среду и выращивают в микроаэрофильных условиях в течение 48 ч.

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

Антигенная структура кампилобактерий сложная, особенно состав термолабильных антигенов. Важнейшие поверхностные Аг представлены липополисахаридами и кислоторастворимыми белковыми фракциями, играющими ведущую роль в серотипировании. Общий Аг энтеробактерий отсутствует. Идентифицирован жгутиковый Н-Аг. В ответ на Аг *Campylobacter spp.* антитела появляются в крови в ранние сроки (на 5-е сут. заболевания титр антител достигает 1:5000) и сохраняются в ней длительное время после заболевания. Также, в антигенном отношении кампилобактерии неоднородны: они четко дифференцируются в реакциях агглютинации и непрямой гемагглютинации. Для их типирования приготовлены моноспецифические сыворотки.

Серологический метод исследования играет огромную роль особенно при масштабных эпидемиологических исследованиях. Для диагностики данной инфекции используются различные серологические реакции, такие как иммунофлюоресценция, агглютинация в пробирке, гемагглютинация, ELYSA, связывание комплемента и др. В настоящее время ELYSA и РСК дают возможность выявлять антитела в гетерологичных сыворотках. Общие антигены позволяют выявлять специфические антитела. Результаты РСК при кампилобактериозе видоспецифичны, так как при использовании антигенов из других микроорганизмов перекрестных реакций не наблюдается.

Для диагностики отдельных случаев заболевания роль серологических методов исследования небольшая. РА ставится с аутоштаммами или живой

музейной культурой, самые точные результаты получают с формализированной культурой. Значимый титр в РА - 1:8-1:32 появляется на 2-ой неделе. РСК видоспецифична, она требует применения специального видового антигена. Наиболее чувствительными являются РИФ и ИФМ, эти системы разработаны за рубежом, а в РФ – экспериментальные партии для РНГА.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Диагностика *Campylobacter spp.* у больных ВЗК

Клинико-лабораторный отбор больных с целью исследования проводился из числа госпитализированных ГБУЗ РБ «Городская клиническая больница» № 21 в 2018-2019 году. У 89 пациентов больных неспецифическим язвенным колитом, болезнью Крона, воспалительных заболеваниях кишечника были собраны клинические образцы биоптатов. У больных наблюдались ярко выраженные симптомы: стул с кровью и слизью, боль в нижней части живота, вздутие брюшной полости, потеря веса.

Для установления диагноза применялись клинические, бактериоскопические и иммунологические методы.

2.2. Выделение ДНК из клинического материала

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

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

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

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

Не захватывая сорбент, удаляли надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Добавляли в пробирки по 300 мкл раствора для отмывки 1, плотно закрыв крышки, перемешивали на вортeксе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге в течение 1 мин при 5 тыс. об/мин. Не захватывая сорбент, удаляли надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Затем добавляли в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 2, плотно закрыв крышки, перемешивали на вортeксе до полного ресуспендирования

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

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

2.3. Амплификация участков ДНК методом полимеразной цепной реакции

В основе метода ПЦР (полимеразной цепной реакции) находится способность ферментов, таких как ДНК-полимераза, проводить нацеленный синтез соответствующей (комплементарной) цепи ДНК, по данной матрице одноцепочечной ДНК, наращивая небольшую олигонуклеотидную затравку (праймер), комплементарную участку этой матрицы, до размеров в несколько тысяч или даже десятков тысяч звеньев. Каждый цикл ПЦР включает в себя три этапа. Денатурация ДНК, имеющаяся в образце, происходит на первом этапе. Для чего реакционную смесь нагревают до температуры в 92-95 °С, в результате этого двухцепочечные молекулы ДНК раздваиваются на одноцепочечные молекулы. На втором этапе совершается

отжиг (присоединение праймеров к ДНК-мишени с получением коротких двухцепочечных участков ДНК, нужных для инициации синтеза ДНК). С новообразованными комплексами праймер и матрица соединяется ДНК-полимераза. Далее, на третьем этапе происходит одновременное копирование ДНК с двух праймеров комплементарных участкам ДНК на противоположных цепях и находящихся таким образом, что полимеризация ДНК с одного праймера запускала синтез цепи ДНК, в которой на конкретном удалении находится участок ДНК, комплементарный другому праймеру. После третьего цикла начинают накапливаться двунитевые фрагменты ДНК, равные расстоянию между двумя праймерами. Полученные в первом цикле цепи ДНК используются матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит синтез нужного специфического фрагмента ДНК генома вируса, бактерий или человека. Впоследствии амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза последующих цепей.

Главные составляющие реакционной среды:

1. ДНК-матрица - выделенная ДНК из исследуемого образца.
2. Праймеры (Forward и Reverse) –синтетические олигонуклеотиды размером от 15 до 30 пар нуклеотидов, комплементарные прямой и обратной цепям определяемого фрагмента и ограничивающие его. Эти праймеры имеют важное значение в образовании продуктов реакции и гарантируют чувствительность и специфичность реакции. Для ПЦР используют 2 праймера, которые ограничивают с двух сторон последовательность.
3. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) - смесь четырех нуклеотидных оснований, «строительных блоков» для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.
4. Taq-полимераза - термостабильный фермент, который отвечает за наращивание новой цепи ДНК.

5. Буферный раствор - реакционная среда, включающая множество ионов, в том числе ионы Mg^{2+} , которые необходимы для сохранения необходимой активности и стабильности фермента.

Амплификацию участков ДНК проводят с использованием типовых наборов на амплификаторе «Терцик МС-2».

Возможно, использование одновременно нескольких пар праймеров в одной реакционной смеси для одновременной амплификации ДНК разнообразных микроорганизмов. Такая модификация называется множественной ПЦР (multiplexPCR). Множественная ПЦР может быть применена для выявления этиологической роли разнообразных микроорганизмов, которые вызывают заболевания определенного типа.

Ход работы:

1. Располагаем в штативе mQ, taq-буфер, дНТФ, пару праймеров для разморозки, после ресуспендируем на вортексе. Taq-полимеразу хранят в морозильнике и добавляют в последнюю очередь.

2. Отбираем нужное количество одноразовых пробирок объемом 0.6 мл, маркируем и расставляем в штатив.

3. Приготавливаем амплификационную смесь для анализируемых проб, содержащую: mQ 16 мкл, Taq-буфер 2,5 мкл, дНТФ 2,5 мкл, taq-полимеразу 0,5 мкл в каждой пробирке на 1.5 мл и разливаем по 24 мкл в каждую пробирку для амплификации на 0.6 мл.

4. В каждую пробирку вносим по 1 мкл ДНК исследуемого образца.

5. На поверхность реакционной смеси наслаиваем минеральное масло в избежание испарения.

6. Пробирки закрываем.

7. Перемещаем пробирки в амплификатор.

8. На ДНК амплификаторе запускаем программу.

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

Этапы проведения амплификации.

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

Инициация - необходима в случае, если активация ДНК-полимеразы осуществляется при помощи 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., при этом идет процесс расплетения двойной спирали ДНК с образованием одноцепочечных молекул.

Этап 2. Отжиг праймеров - происходит образование комплементарного связывания праймеров с ДНК-матрицей, температура отжига характерна для каждой пары праймеров и ее значения находится в интервале 50-65° С, время прохождения реакции 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. 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 увеличение роста накопления целевых фрагментов ДНК (ампликонов) в реакционной смеси. Этого количества хватает для визуального обнаружения ПЦР-продукта методом электрофореза в агарозном геле.

Программа амплификации:

- | | |
|--------------------------------|-------------|
| 1. Денатурация – 95°C – 20 сек | } 30 циклов |
| 2. Отжиг – 60°C – 20 сек | |
| 3. Элонгация – 72°C – 30 сек | |

Для усовершенствования работы ферментов и сокращения количества неспецифичных продуктов амплификации может быть использована ПЦР с

«горячим стартом». В этой вариации Taq-полимераза, разбавленная в 10мкл соответствующего 1-кратного буфера, попадает в реакционную смесь после прогрева до 94°C, этот процесс помогает избежать неспецифического отжига праймеров на нуклеотидных последовательностях с низкой гомологией.

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

2.4. Анализ электрофореграммы ДНК

Добавляли необходимое количество порошка агарозы (1,7 г) в отмеренный объем буфера (2мл 50х TAE буфера и 98мл очищенной воды). Прогревали смесь в микроволновой печи до полного и равномерного расплавления геля около 2-3 мин, периодически помешивая. Раствор остужали до 50°C. В заливочную камеру помещали чисто вымытую стеклянную пластинку. На одном из краев камеры установили пластиковый гребешок так, что его зубцы образовали в геле лунки для проб ДНК. Обязательно, чтобы между концом зубчиков и стеклянной пластинкой оставался зазор 0,3-0,5 см. Этот процесс требует аккуратности при заливании жидкой агарозы толщиной около 5мм. После затвердения агарозы (15-20 мин) аккуратно вынимали гребенку, стараясь не повредить образовавшиеся кармашки. Пластинку с гелем из камеры размещали в электрофоретическую камеру. Заливали в камеру буфер так, что он покрыл агарозу сверху тонким слоем 2-3 мм.

Добавляли 3 мкл красителя бромфенолового синего с ксиленианолом и глицерином. Отбирали 10мкл раствора ДНК из эппендорфа на пластинку для нанесения проб. Перемешивали пипеткой. Неспешно наносили

автоматической пипеткой пробу ДНК с красителем в лунку геля под слой буфера. Подключали клеммы прибора к источнику питания так, чтобы(-) находился на старте, а (+) - на финише. Включали источник питания и устанавливали напряжение в 100 вольт. Проводили разделение ДНК в течение 20 мин. Вынимали пластинку с гелем и помещали ее в кювету для окрашивания. Наливали в кювету слабый раствор бромистого этидия. Окрашивали в течение 7-10 мин. Сливали краситель в колбу. Промывали гель проточной водой. Помещали его на стекло трансиллюминатора. Фотографировали гель на фотосистеме GelCameraSystem (UVP, Inc. США).

2.5. Выделение ДНК с использованием магнитных частиц

Метод выделения ДНК при помощи магнитных частиц заключается в том, что в исследуемый образец добавляются магнитные частицы и специальное лизирующее средство. Частицы связывают выделившуюся ДНК, а в процессе очищения происходит вымывание оставшихся клеточных элементов. Завершающим шагом становится элюирование молекулы низко солевым буфером.

Плюсы данного метода:

возможность выделять большое количество нуклидов за счёт большого объёма сорбента;

в момент выделения минимизированы потери;

малый риск перекрёстной контаминации, так как почти все нуклеиновые молекулы связываются сорбентом; · масштабность методики;

высокое качество продукта на выходе.

Из биоптатов изготовить срезы ткани и поместить их в чистые сухие пробирки.

1. Пробирки со срезами поместить в портативный термостат, установить температуру на 93°C, дождаться плавления парафина.

2. Не вынимая пробирки из термостата, к каждой пробе добавить 50 мкл магнитных частиц («Sileks» MagNA, Россия)
 3. Пробирки извлечь из термостата, перемешать на вортексе.
 4. Внести к каждой пробе по 100 мкл лизирующего буфера («Sileks», Россия), ресуспендировать на вортексе в течение 5-10 сек.
 5. Отобрать с помощью дозатора светлую фазу и избавиться от нее, не задевая осадок (магнитные частицы).
 6. Внести к каждому образцу по 200 мкл отмывочного раствора.
 7. Ресуспендировать содержимое пробирок на вортексе в течении 10-15 секунд.
 8. С помощью дозатора отбирать прозрачную фазу, не задевая магнитных частиц.
 9. Пробирки с открытой крышкой поместить в портативный термостат при 65°C на 5-10 мин для подсушивания.
 10. Внести к каждой пробе по 50 мкл буфера для элюции («Sileks», Россия).
 11. Ресуспендировать на вортексе в течение 5-10 сек.
 12. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13 об/мин в течение 5 мин.
 13. С помощью дозатора осторожно отбирать надосадочную жидкость, содержащую очищенную ДНК и перенести в чистые пробирки.
- Пробы готовы к постановке ПЦР.

2.6. Проведение Real-time PCR

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

Ход работы:

1. Подготовили и расставили в штативе пробирки с тотальной ДНК, 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I, mQ, растворы праймеров для разморозки; ресуспендировали на вортексе.
2. Отобрали пинцетом необходимое количество одноразовых стерильных пробирок объемом 0,2 мл и расставили в штатив надлежащим образом.
3. В подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки раскапали в них по 9 мкл mQ, после чего внесли по 10 мкл 2,5х-ной реакционной смеси, используя наконечники без фильтра.
4. В каждую пробирку добавили по 1мкл растворов праймеров, предварительно разведенных до 20.е.
5. Внесли по 3 мкл в каждую пробирку исследуемого образца ДНК, при этом для каждой пробы использовался отдельный наконечник с фильтром.
6. Плотнo закрыли пробирки, перемешали содержимое встряхиванием, затем переместили пробирки в амплификатор и расставили соответствующим образом.
7. На приборе создали эксперимент с соответствующими параметрами плашки где указали: размер, тип, режим сканирования, флуорофор, названия проб; объем реакционной смеси в одной пробирке. Затем запускали программу со следующими параметрами:

	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95°C	5 мин	1
Денатурация	95°C	10 сек	38
Отжиг	60°C	25 сек	
Элонгация	72°C	30 сек	
Достраивание цепей ДНК	72°C	30 сек	1

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Выделения ДНК с помощью комплекта "ДНК-сорб-С"

Заключенные в парафин участки толстого кишечника были подвержены демаскировке при помощи заморозки и готового комплекта реагентов, после чего следовал этап выделения ДНК и ПЦР-анализ продуктов амплификации. Метод оказался неэффективным и из 15 образцов биоптатов положительных не оказалось. Для подтверждения результата был поставлен ПЦР в режиме реального времени, где результаты также были отрицательными. Было принято решение выбрать другой способ депарафинизации и выделения ДНК из биоптатов.

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

После проведения анализа в электрофоретическом геле бактерии рода *Campylobacter* обнаружено не было, значит, данный способ демаскировки является не эффективным или ДНК выделяется в недостаточном количестве.



Рисунок 1 –Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК
Campylobacter spp.

Было принято решение использовать другой метод для демаскировки и выделения ДНК из парафиновых блоков.

3.2. Выделения ДНК с помощью магнитных частиц

Метод выделения ДНК при помощи магнитных частиц имеет множество плюсов:

1. Возможность выделять большое количество нуклеотидов за счет большого объема сорбента.
2. В момент выделения минимизированы потери.
3. Малый риск перекрестной контаминации, так как почти все нуклеиновые молекулы связываются сорбентом.
4. Высокое качество продукта на выходе.

Принцип метода заключается в следующем:

В исследуемый образец добавляют магнитные частицы и лизирующий раствор. Магнитные частицы связывают выделившуюся ДНК, а в процессе очищения происходит вымывание клеточных элементов, тогда как магнитные частицы с ДНК осаждаются на дне пробирки.

Учитывая все преимущества данного метода, было решено провести депарафинизацию за счет плавления парафина, а затем выделить ДНК при помощи магнитных частиц.

Plots Report

Test type: Nucleic Acid

18.03.2019 14:09

Exit

Report Name

Report Full Mode Ignore

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
22	Default	18.03.2019	13:56	533.71	10.674	6.206	1.72	2.08	50.00	230	5.138	1.297
14	Default	18.03.2019	13:57	378.46	7.569	4.505	1.68	1.80	50.00	230	4.206	2.060
15	Default	18.03.2019	13:58	340.76	6.815	4.436	1.54	1.65	50.00	230	4.120	1.497
16	Default	18.03.2019	13:58	263.66	5.273	3.482	1.51	1.37	50.00	230	3.837	1.370
18	Default	18.03.2019	13:59	343.01	6.860	4.808	1.43	1.46	50.00	230	4.706	1.657
17	Default	18.03.2019	13:59	379.01	7.580	5.051	1.50	1.62	50.00	230	4.691	1.529
23	Default	18.03.2019	14:00	403.98	8.080	4.866	1.66	1.83	50.00	230	4.405	1.221
24	Default	18.03.2019	14:00	-118.95	-2.379	-1.319	1.80	1.11	50.00	230	-2.150	0.397
25	Default	18.03.2019	14:01	486.05	9.721	6.326	1.54	1.78	50.00	230	5.458	2.032
25	Default	18.03.2019	14:01	294.70	5.894	4.056	1.45	1.62	50.00	230	3.638	1.395
27	Default	18.03.2019	14:02	287.30	5.746	3.934	1.46	1.54	50.00	230	3.740	1.509
29	Default	18.03.2019	14:02	509.18	10.184	6.047	1.68	1.89	50.00	230	5.391	1.346
28	Default	18.03.2019	14:03	210.94	4.219	2.551	1.65	1.73	50.00	230	2.435	0.834
30	Default	18.03.2019	14:03	426.44	8.529	5.164	1.65	1.81	50.00	230	4.713	1.154
31	Default	18.03.2019	14:04	494.60	9.892	6.138	1.61	1.82	50.00	230	5.435	1.372
32	Default	18.03.2019	14:04	459.98	9.200	5.854	1.57	1.80	50.00	230	5.115	1.754
33	Default	18.03.2019	14:05	521.13	10.423	6.568	1.59	1.83	50.00	230	5.688	1.571
34	Default	18.03.2019	14:05	232.91	4.658	3.311	1.41	1.43	50.00	230	3.252	1.320
35	Default	18.03.2019	14:06	327.73	6.555	4.608	1.42	1.47	50.00	230	4.473	1.595
36	Default	18.03.2019	14:06	288.34	5.767	3.771	1.53	1.68	50.00	230	3.425	1.214
38	Default	18.03.2019	14:07	-80.04	-1.601	-1.015	1.58	0.85	50.00	230	-1.883	1.881
37	Default	18.03.2019	14:07	284.44	5.689	3.739	1.52	1.61	50.00	230	3.534	1.335
39	Default	18.03.2019	14:08	380.56	7.611	4.729	1.61	1.85	50.00	230	4.106	1.295
48-2	Default	18.03.2019	14:08	395.45	7.909	5.534	1.43	1.80	50.00	230	4.403	1.816
127	Default	18.03.2019	14:09	443.38	8.868	6.220	1.43	1.70	50.00	230	5.215	2.276

Рисунок 2–Результаты проверки ДНК на приборе Thermo Scientific NanoDrop 2000.

Прибор Thermo Scientific NanoDrop 2000 (спектрофотометр) предназначен для микрообъёмов, производит определение спектра поглощения препарата в диапазоне длин волн 190-840 нм.

Столбец № 5 отображает количество выделенной ДНК из образца, отрицательные показатели не коррелируют с отсутствием ДНК

Столбец № 8 отображает качество выделенной ДНК.

3.3.Подбор оптимальных условий для амплификации участков ДНК

Праймер к *Campylobacter spp.* было решено выбрать из статьи «Developments in Rapid Detection Methods for the Detection of Foodborne *Campylobacter* in the United States» (Steven C. Ricke1, Kristina M. Feye1, W. Evan Chaney,2019)

Был выбран праймер: 5'-AGAACACGCGGACCTATATA-3'

5'-CGATGCATCCAGGTAATGTAT-3'

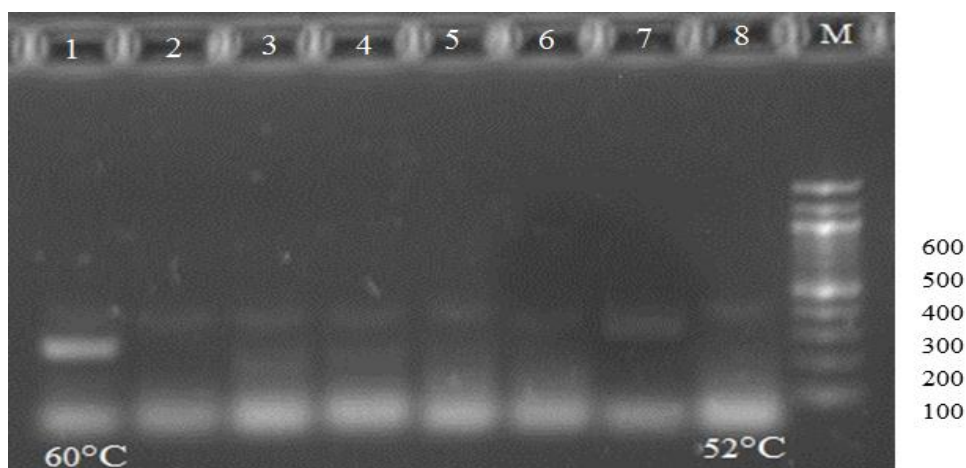


Рисунок 4—Электрофореграмма градиента температур от 52°C до 60°C.

При выборе режима амплификации был выставлен градиент температур от 52°C до 60°C. На электрофореграмме наблюдается амплификация участка гена 16s РНК *Campylobacter spp.* размером 256п.н. при температуре 60°C.

3.4. Полученные результаты исследования классической ПЦР

При проведении анализа в электрофоретическом геле бактерии рода *Campylobacter spp.*

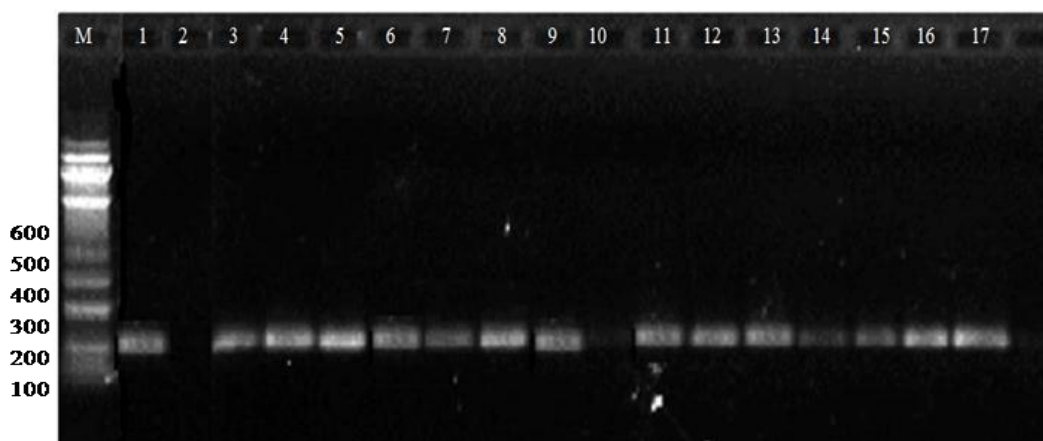


Рисунок 5—Электрофореграмма результатов амплификации участка гена 16s РНК *Campylobacter spp.* размером 256п.н.

Из 17 положительных образцов отрицательным оказался только №2, образец №10 дал слабо положительный результат.

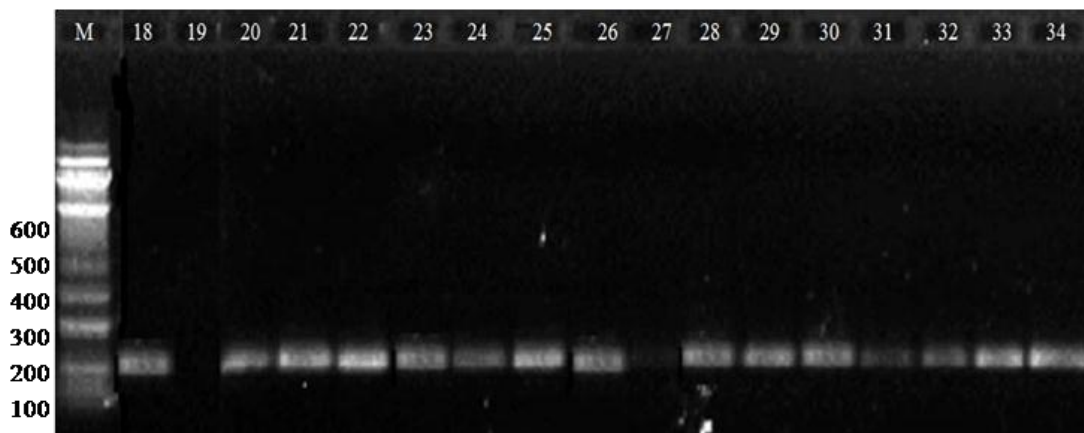


Рисунок 6—Электрофореграмма результатов амплификации участка гена 16s РНК *Campylobacter spp.* размером 256п.н.

Из 17 положительных образцов отрицательным оказался только №19

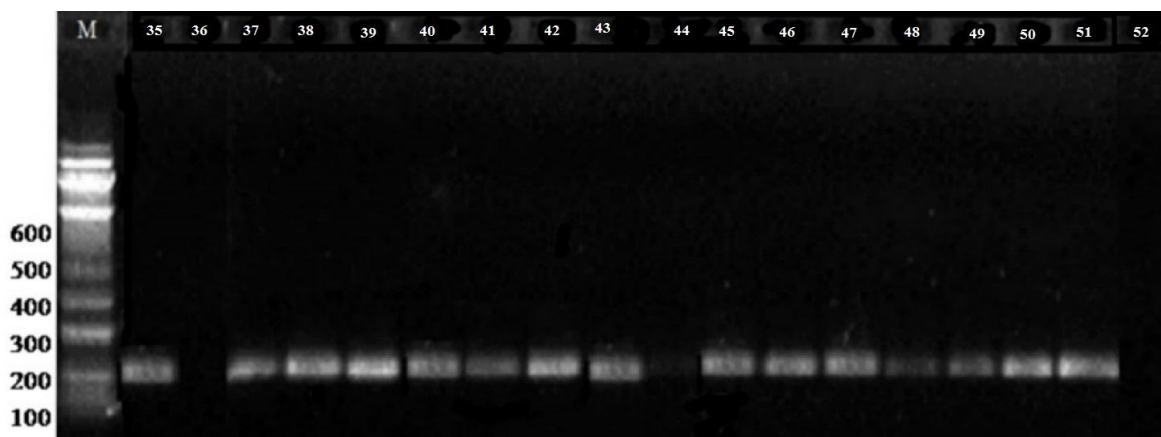


Рисунок 7—Электрофореграмма результатов амплификации участка гена 16s РНК *Campylobacter spp.* размером 256п.н.

Из 18 положительных образцов отрицательными оказались только № 36, 44,52

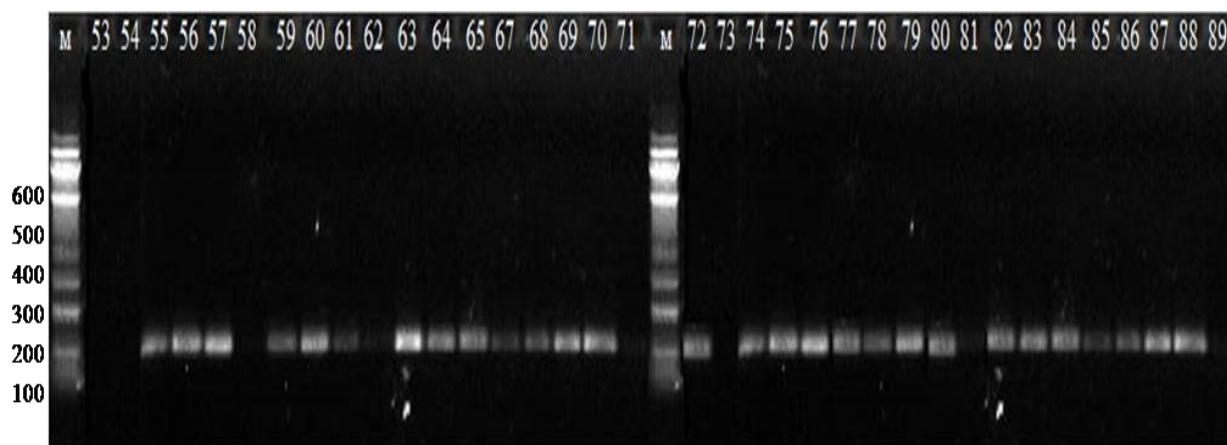


Рисунок 8—Электрофореграмма результатов амплификации участка гена 16s РНК *Campylobacter spp.* размером 256п.н.

Из 37 положительных образцов отрицательным оказался только №53,54,58, образцы №62,71,73,81,89, дали слабо положительный результат.

3.5. Полученные результаты исследования Real-time PCR

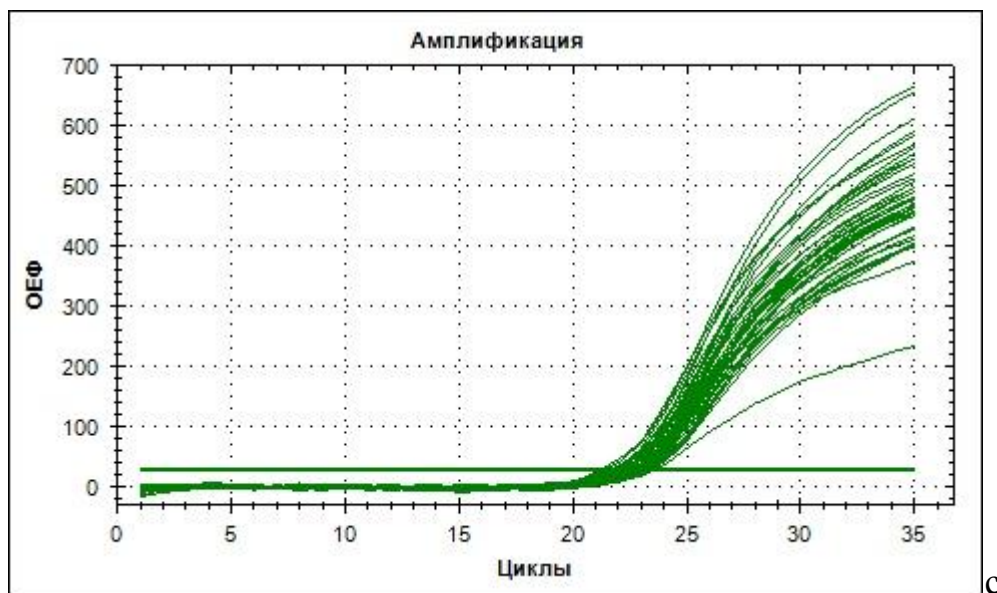


Рисунок 9 –Результаты амплификации ПЦР в режиме реального времени при выделении ДНК при помощи магнитных частиц (температура отжига 60°C)

Данный график показывает, что в депарафинизированных биоптатах была обнаружена ДНК *Campylobacter spp.* 80 исследуемых образцов были положительными, а 9 образцов дали слабоположительный результат.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения данной работы были подобраны методы выделения и детекции бактерии рода *Campylobacter* из вырезов кишечника заключенных в парафин.

Для выделения ДНК из биоптатов были использованы 2 способа демаскировки. Первый способ – это выделение при помощи набора "ДНК-сорб-С", в результате которой не была детектирована ДНК бактерий рода *Campylobacter*. Второй способ – выделение при помощи магнитных частиц ДНК из ткани, фиксированной в формалине и заключенной в парафин, дал результат. Из исследуемых 89 образцов только 9 показали отрицательный результат. Таким образом, второй использованный метод был наиболее подходящим для выделения ДНК из биоптатов и имел больше преимуществ перед предыдущим методом: быстрый лизис ткани, отсутствие органических растворителей.

Для проведения ПЦР анализа было решено подобрать праймеры из статьи, что дало положительный результат.

Таким образом, подобран и испытан метод для детекции бактерий рода *Campylobacter* пригодный для применения в диагностических целях.

ВЫВОДЫ

1. Для выделения ДНК из парафиновых блоков оптимальным являлся метод выделения при помощи магнитных частиц, что позволило выявить искомые микроорганизмы в 80 из 89 исследованных парафиновых блоков биоптатов пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.

2. Для конечного анализа образцов ДНК, выделенных из клинического материала больных, были использованы 2 метода ПЦР: классический и Real-time. Результаты классического ПЦР таковы, 81 образец дали положительный результат, а 8 отрицательный результат. Результаты Real-time таковы, 80 образцов дали положительный результат, а 9 образцов дали слабоположительный результат.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров В.А. Основы иммунной системы желудочно-кишечного тракта. — Методическое пособие. — Санкт-Петербург: МАПО, 2006. — С. 44.
2. *Беляков В. Д., Яфаев Р. Х. «Эпидемиология», 1989*
3. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Никишина Н.М.; Ульяновский ГСА; Методы частной бактериологии: учебно-методическое пособие /. - С. 175 – 183. Ульяновск, 2006
4. Воробьев Г.И., Халиф И.Л. Неспецифические воспалительные заболевания кишечника. — М.: Миклош, 2008. — 400 с.
5. Григорьева Л.В., Корчак Г.И., Малахова Л.А. Использование красок для выявления факторов патогенности эшерихий и сальмонелл // Лаб. дело. – 1992. – № 2. – С. 57–59.
6. Дорофеев А.Э. Клинико-патогенетическая характеристика неспецифического язвенного колита с внекишечными поражениями и оптимизация его терапии: автореф. дис. д-ра. мед. наук.: 14.01.36 / А.Э. Дорофеев — Днепропетровск, 2004; 40.
7. Дорофеев А.Е., Швец О.В., Эпидемиология и факторы риска при воспалительных заболеваниях кишечника. 2014; (11):22–9.
8. Маев И. В., Черемушкин С. В. Синдром раздраженного кишечника: Учебное пособие. — М., ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2004.
9. Охапкин М.Б. Прогноз позднего гестоза и задержки роста плода по данным доплерометрии // Ультразвуковая диагностика в акушерстве, гинекологии и педиатрии – 1993. – № 1. – С. 42–45.
10. Полуэктова Е.А., Ляшенко О.С., Королев А.В. Механизмы, обеспечивающие взаимодействие бактериальных клеток с организмом хозяина, и их нарушение у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2014; 5: 42–53.

11. Радчука Н.А. Ветеринарная микробиология и иммунология. – М.: Агропромиздат, 1991. – 382 с.
12. Сичинский Л. А. Кампилобактериозы. Этиология и лабораторная диагностика / Л. А. Сичинский // Здоровоохранение Молдавии. 1991. - №2. - С. 51-55.
13. Стрижаков А.Н. Информативность доплерометрии в прогнозировании возникновения гестозов и синдрома задержки развития плода // Акуш. и гин. – 1990. – № 7. – С. 12–15.
14. Урсова Н.И. Дисбактериозы кишечника у детей. Руководство для практикующих врачей / Под ред. профессора Г.В. Римарчук. — М., 2006. — С. 240.
15. Чайка Н.А., Хазенсон Л.Б., Бутцлер Ж.П. Кампилобактериоз. - 1988.
16. Чайка Н.А. и др. // Современная медицина – 1981. - №10. – С. 64-69.
17. Шманов К.С. Некоторые биологические свойства *Campylobacter jejuni*: бюллетень Всесоюзного ордена Ленина / К.С. Шманов, И.П. Иренков// НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. М., 1984. - Вып. 56. -С. 36-39.
18. Щеплягина Л.А., Чернов В.М., Круглова И.В., Делягин В.М. Возрастные особенности иммунитета у детей. Лекция для врачей. — М., 2008. — С. 36.
19. Biancone L., Monteleone J., Del Vecchio Blanco G., et al. Resident bacterial flora and immune system // Dig Liver Dis., — 2002. — Sup. 2. — P. 37-43.
20. Blaser M.J., Hoverson D., Ely I.G., Duncan D.J., Wang W.L., and Brown W.R., 1984. Studies of *Campylobacter jejuni* in patients with inflammatory bowel disease. Gastroenterology 86, 33–38.
21. Dasti J. I., Tareena A. M., Lugerta R. Et al. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating

mechanisms // Int. J. Med. Microbiol. — 2009; doi: 10.1016 / j. ijmm. 2009.07.002.

22. Kaur N., Chen C.C., Luther J., Kao J.Y. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. Gut Microbes 2011; 2: 211-216.

23. LanganR.C., GotschP.B., KrafczykM.A. etal. Ulcerative colitis: diagnosis and treatment. Am Fam Physician. 2007; 76(9):1323–30.

24. Moore J.E., Corcoran D., Dooley J.S.G., Fanning S., Lucey B., et al. (2005) *Campylobacter*. Vet Res 36: 351–382.

25. Podolsky D.K. (2002) Inflammatory bowel disease. New Engl J Med.

26. Rodriguez L. A., Ruigomez A. Increased risk of irritable bowel syndrome after bacterial gastro-enteritis: cohort study // BMJ. — 1999. — Vol. 318. — P. 565 – 566.

27. Tam C. C., Rodrigues L. C., O'Brien S. J. Guillain-Barre syndrome associated with *Campylobacter jejuni* infection in England, 2000–2001 // Clin Infect Dis. — 2003. — Vol. 37 (2). — P. 307–310.

28. Vandamme P., Dewhirst F.E., Paster B.J., On SLW (2005) Genus I. *Campylobacter*. In: Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 ed. New York: Springer. pp 1147–1160.

29. Wehkamp J., Schmid M., Stange E.F. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease // Curr. Opin. Gastroenterology. — 2007. — Vol. 23. — P. 370-378.

30. Weinstock G.M. Genomic approaches to studying the human microbiota. Nature 2012; 489: 250-256.

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

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



Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: li9902343485@yandex.ru / ID: 6790113

Проверяющий: li9902343485@yandex.ru / ID: 6790113

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

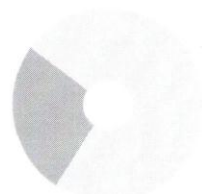
ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 2
Начало загрузки: 10.06.2019 10:01:11
Длительность загрузки: 00:00:01
Имя исходного файла: Кудряшова К.Е.
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ
БАКТЕРИЙ РОДА SAMPYLOBACTERB
БИОПТАТАХ
Размер текста: 796 кБ
Символов в тексте: 48948
Слов в тексте: 5936
Число предложений: 560

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
Начало проверки: 10.06.2019 10:01:13
Длительность проверки: 00:00:04
Комментарии: не указано
Модули поиска: Модуль поиска Интернет

ЗАИМСТВОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
26,45%	0%	73,55%



Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты, общепотребительные выражения, фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которому шла проверка, по отношению к общему объему документа.

Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.

Уделите больше внимания, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом она является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	0%	Скачать выпуск 3 2012	http://pediatr.gpma.ru	21 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет
[02]	4,67%	Download 2012 #3 (10/10)	http://pediatr.gpma.ru	09 Сен 2016	Модуль поиска Интернет
[03]	3,08%	https://esu.citrus.ru/dissertation/PFVXFDXH1DJJVSADV4FHWX7	https://esu.citrus.ru	20 Мар 2018	Модуль поиска Интернет

Еще источников: 17

Еще заимствований: 18,69%

Работу проверила: Салыхова Л.В. *Л.В.*

10.06.2019г.

Зав. библиотекой *Чоф*

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

ОТЗЫВ

внутреннего рецензента Шве́ц Ксении Юрьевны на выпускную квалификационную работу Кудряшовой Кристины Евгеньевны
«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *CAMPYLOBACTER* В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА»

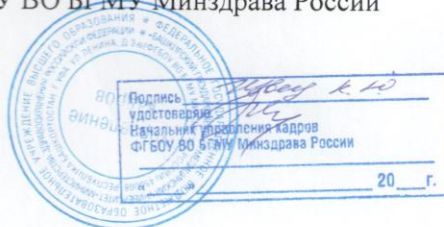
Одной из самых серьезных проблем в современной гастроэнтерологии являются воспалительные заболевания кишечника, к которым относятся язвенный колит и болезнь Крона. Воспалительные заболевания кишечника представляют собой хронический воспалительный процесс, который затрагивает весь кишечник или часть желудочно-кишечного тракта. Это приводит к болям в животе, диарее, нарушению всасывания в кишечнике. Данная работа направлена на выявление бактерий рода *Campylobacter*, которые, как считается, причастны к развитию данного заболевания. Несмотря на сложности депарафинизации и выделения ДНК из биоптатов работа дала положительный результат.

Автором при написании дипломной работы сохранена традиционная структура, а именно в ней представлены такие разделы, как введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, представление собственных данных и их обсуждения, заключение, выводы, список цитируемой литературы, приложения. Сформулированные в работе выводы достаточно обоснованы и могут быть использованы в практической деятельности.

Таким образом, выпускная квалификационная работа Кудряшовой Кристины Евгеньевны «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *CAMPYLOBACTER* В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА», выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора Мавзютова Айрата Радиковича, является завершенной 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 положительной оценки.

ассистент кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

К.Ю. Шве́ц



ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Кудряшова Кристина Евгеньевна выполнила выпускную квалификационную работу на тему «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *SAMPYLOBACTER* В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА»

За время обучения в БГМУ Кудряшова К.Е. освоила учебную программу в достаточном объеме. Все годы училась хорошо.

В процессе выполнения ВКР Кудряшова К.Е. приобрела необходимые навыки работы, такие как проведение депарафинизации парафиновых блоков, используемых для исследования биоптатов, освоила основные методы выделения ДНК, приобрела навыки проведения исследований при использовании ряда вариантов полимеразной цепной реакции (классическая ПЦР и Real-time PCR).

В ходе выполнения ВКР Кудряшова К.Е. продемонстрировала компетенции, которыми должен обладать обучающийся по окончании учебы по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (профиль - микробиология).

Таким образом, может выполненная Кудряшовой К.Е. Саньчковым выпускная квалификационная работа и показанные в ходе этого знания, умения и практические навыки свидетельствуют, что она соответствует требованиям ФГОС ВО (Приказ Минобрнауки РФ №944 от 07.08.2014 г.) к обучающимся по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (бакалавриат) и заслуживает положительной оценки.

Научный руководитель:
Заведующий кафедрой
фундаментальной и прикладной
микробиологии, д.м.н., профессор



А.Р.Мавзютов

ОТЗЫВ

внешнего рецензента Матниязов Рустам Тахирович на выпускную квалификационную работу Кудряшовой Кристина Евгеньевны «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *CAMPYLOBACTER* В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА»

Исследование биоптатов больных ВЗК на обнаружение в них *Campylobacter spp.* будет полезным в постановке диагноза.

Теоретическая значимость работы заключается в возможности использования полученных результатов при постановке диагноза больным ВЗК.

Автором при написании дипломной работы сохранена традиционная структура, а именно в ней представлены разделы введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, представление собственных данных и их обсуждения, заключение, выводы, список цитируемой литературы, приложения. Сформулированные в работе выводы достаточно обоснованы и могут быть использованы в практической деятельности.

Таким образом, выпускная квалификационная работа Кудряшовой Кристины Евгеньевны «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *CAMPYLOBACTER* В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА» выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора Мавзютова Айрата Радиковича является завершенной 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 положительной оценки.

Должность рецензента
к.б.н., научный сотрудник

