

# Методы микробиологической диагностики

# Методы микробиологической диагностики

---

1. Микроскопический
  2. Микробиологический (бактериологический и вирусологический) - выделение чистой культуры и ее идентификация.
  3. Биологический - заражение лабораторных животных (биопроба).
  4. Иммунологический (серологический, аллергологический) - используется для выявления **антигенов** возбудителя или **антител** к ним.
  5. Молекулярно-генетический - ДНК- и РНК- зонды, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и многие другие.
- 



## Классическая микробиология

---

- ▶ Выделение чистой культуры
- Идентификация
- Определение чувствительности к АМП
- ▶ Детекция АГ (РИФ, ИФА, ПЦР)
- ▶ Детекция АТ (серологические реакции, ИФА)

## «Новая» микробиология

---

- ▶ Выделение чистой культуры
  - Идентификация автоматизированная или MS
  - Автоматизированное определение чувствительности к АМП
  - ▶ Детекция генов 16s рРНК
  - ▶ Детекция генов резистентности
- 



# Характеристика бактериологического метода диагностики

---

- ▶ Бактериологический метод диагностики основан на выделении чистой культуры бактерий и идентификации ее по свойствам в лабораторных условиях.

Чистая культура- популяция одного вида микроорганизмов, выделенная на ПС.

Идентификация – установление видовой принадлежности микроорганизма.

С этой целью определяют морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические и антигенные свойства.

---



# Культивирование микроорганизмов

Метод культивирования	Микроорганизмы
<p><b>In vivo:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>■ Культура клеток</li><li>■ Птичий эмбрион</li><li>■ Организм животного</li></ul>	<p>Облигатные паразиты:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>■ Риккетсии</li><li>■ Хламидии</li><li>■ Вирусы</li></ul>
<p><b>In vitro:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>■ Искусственные питательные среды</li></ul>	<p>Почти все патогенные бактерии</p>



# Классификация искусственных питательных сред

---

- ▶ **По консистенции**

- ▶ Жидкие
- ▶ Полужидкие (0,5% агара)
- ▶ Плотные (1,5-2% агара, свернутые)



# Классификация искусственных питательных сред

---

## ▶ По назначению

### ▶ Основные

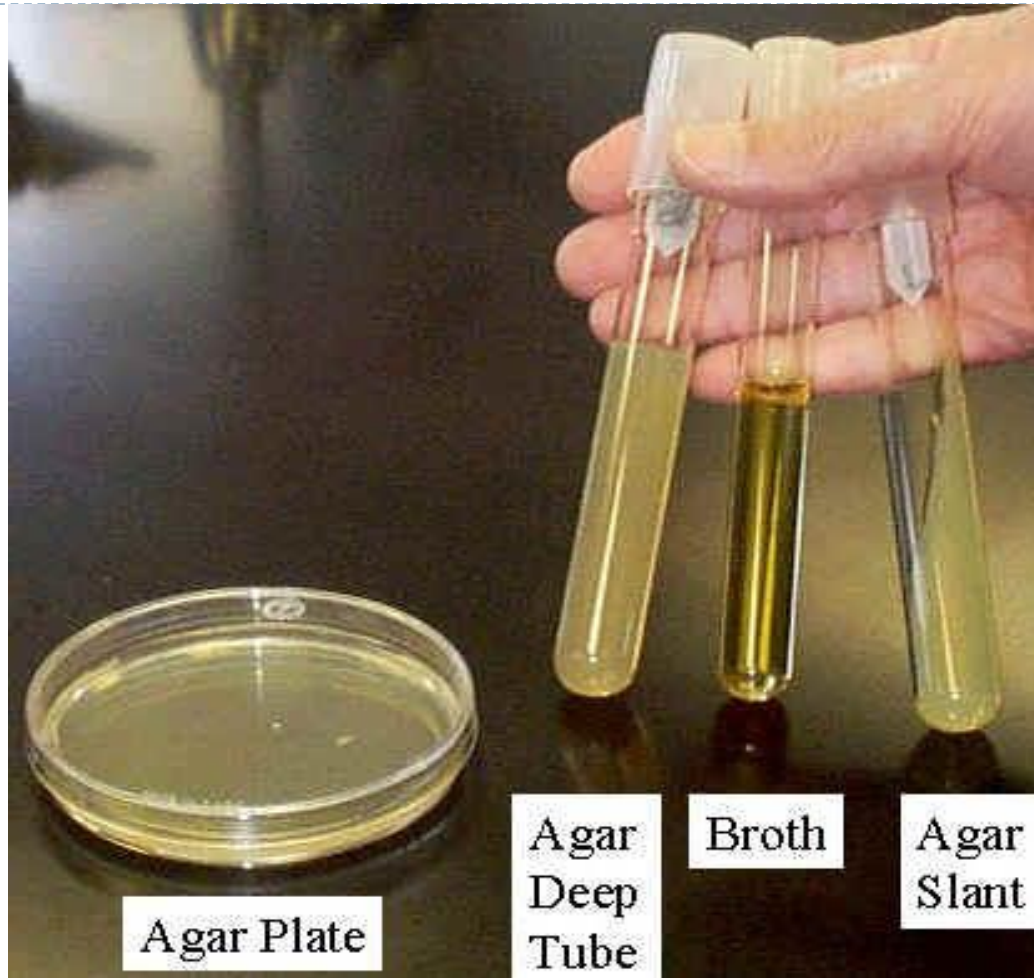
- ▶ Универсальные (простые натуральные)
- ▶ Специальные (сложные натуральные)

### ▶ Элективные (селективные)

### ▶ Дифференциально-диагностические

### ▶ Консервирующие

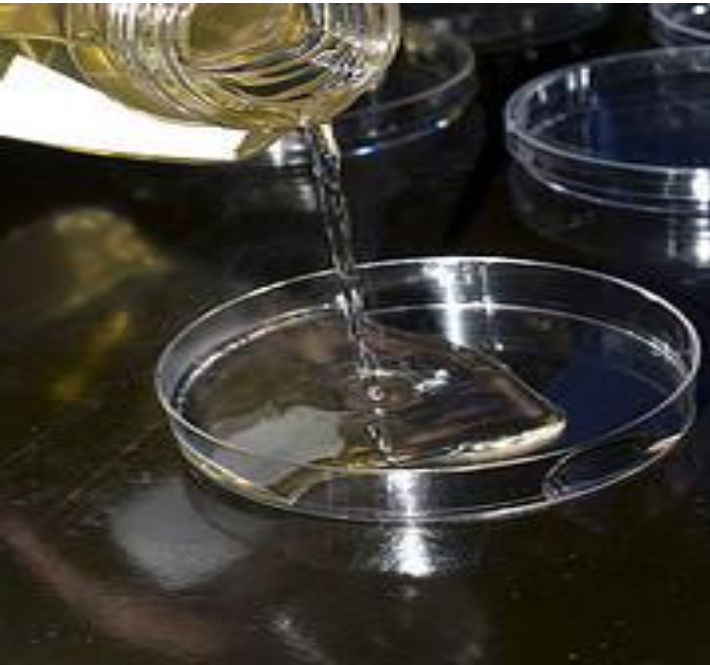






# Простые(универсальные, основные) питательные среды

---



- ▶ мясо-пептонный бульон (**МПБ**)  
— жидкая среда
- ▶ мясо-пептонный агар (**МПА**) —  
плотная среда
- ❖ Обеспечивают рост  
большинства бактерий
- ❖ Служат основой для  
приготовления сложных сред



# Сложные среды с повышенной питательной ценностью

---



- ▶ Обогащенные углеводами (сахарный бульон/агар)
- ▶ Обогащенные белками (кровяной, сывороточный, асцит бульон/агар)

Рост гноеродного стрептококка на кровяном агаре (вокруг колоний видны зоны гемолиза)

---



# Элективные (избирательные) питательные среды

---

- Обеспечивают преимущественный рост определенной группы бактерий

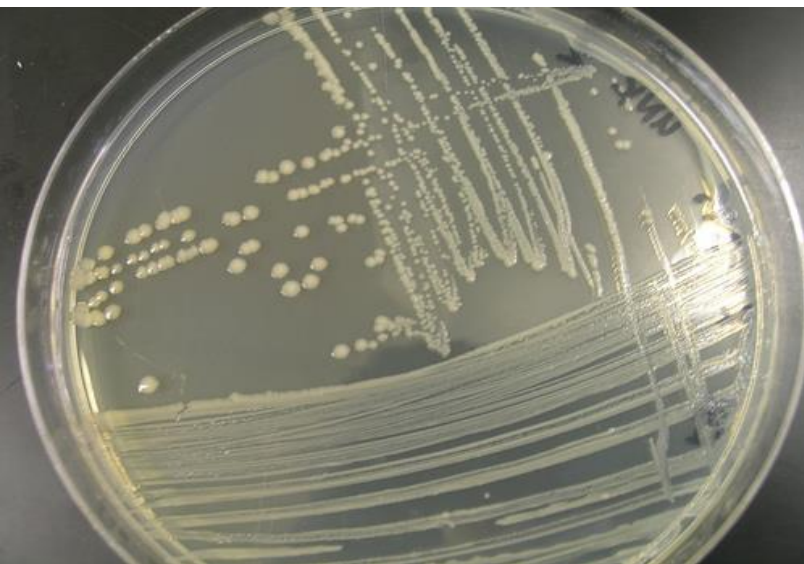


*Среда Леффлера* (свернутая сыворотка крови с сахарным бульоном) - эффективна для дифтерийной палочки

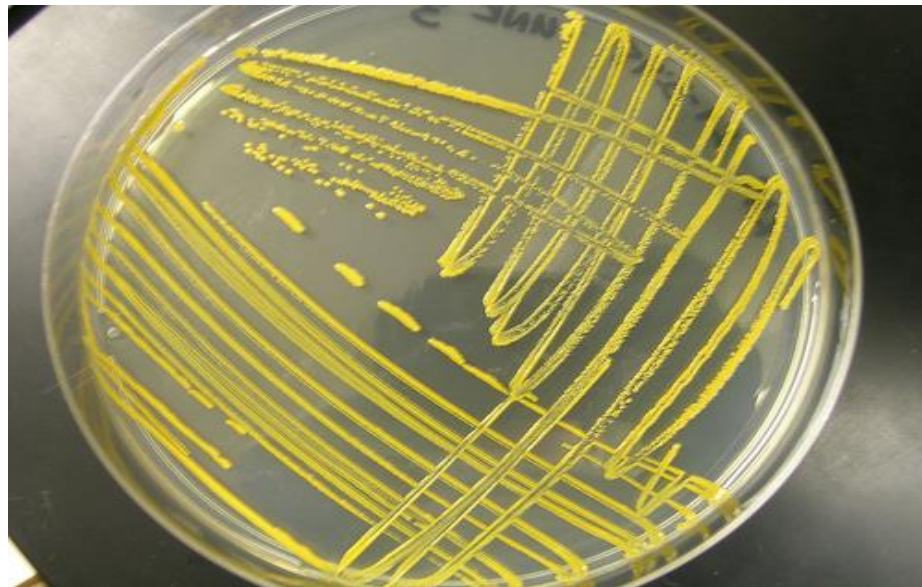
---

# Элективные (избирательные) питательные среды (продолжение)

---



*Щелочной агар* для холерного вибриона

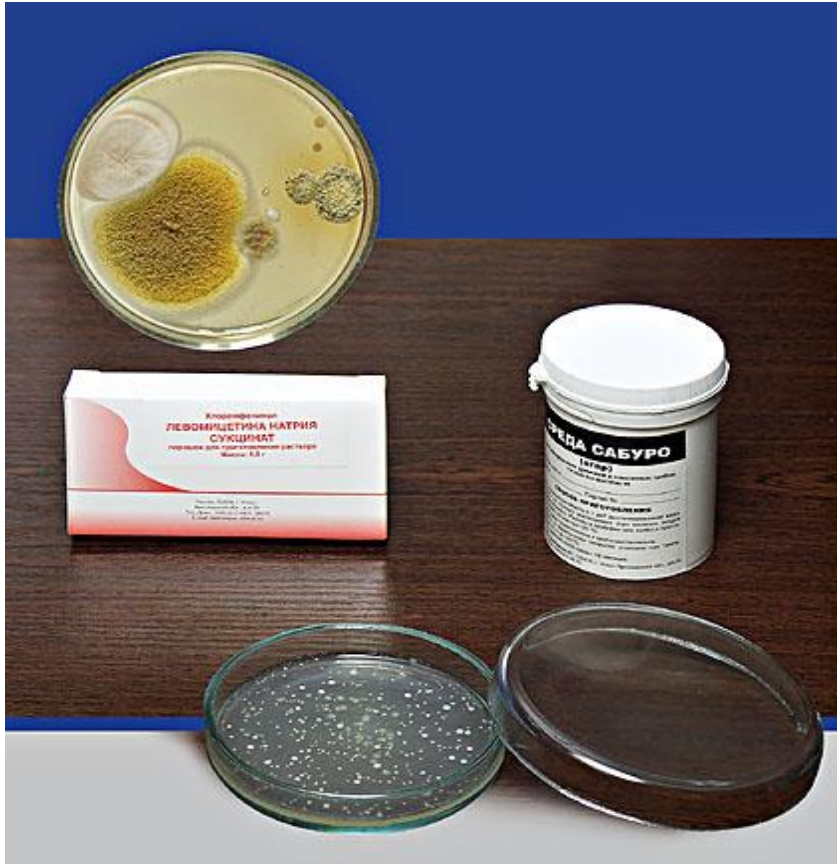


*Желточно-солевой агар* для *S. aureus*



# Элективныe (избирательные) питательные среды (продолжение)

---



*Агар Сабуро*  
для обнаружения дрожжей и  
плесневых грибов



# Дифференциально-диагностические среды

---

- ▶ Позволяют дифференцировать группы или виды бактерий по ферментативной активности
- ▶ *Среды Эндо, Левина, Плоскирева* – используются для выделения чистой культуры энтеробактерий на 1 этапе; позволяют дифференцировать бактерии, способные и неспособные ферментировать лактозу
- ▶ *Среды Гисса* – используются на 3 этапе выделения чистой культуры для определения спектра сахаролитической активности.



## Среда Эндо



**Salmonella и Shigella**  
**не способны**  
**ферментировать**  
**лактозу**

# Среда Плоскирева





## Среды Гисса :

Состав: МПА, набор углеводов, индикатор

Принцип действия: при ферментации углевода образующиеся кислые продукты меняют pH, при этом изменяется окраска индикатора



# Хромогенные питательные среды

---

- ▶ В целях ускорения исследования, значительного сокращения объема работы и материальных средств в последние годы разработана группа хромогенных питательных сред для одноэтапного выделения и прямой идентификации наиболее частых и значимых в медицине микроорганизмов.



- ▶ Хромогенные питательные среды основаны на выявлении специфических или уникальных ферментов микроорганизмов. Для обнаружения специфического фермента в составе среды включают хромогенные субстраты - вещества, при расщеплении которых образуются окрашенные или флюоресцирующие продукты (светятся в УФ - свете) В результате хромогенная среда контрастно изменяет свой цвет или флюоресцирует при обнаружении искомого микроорганизма.
- 



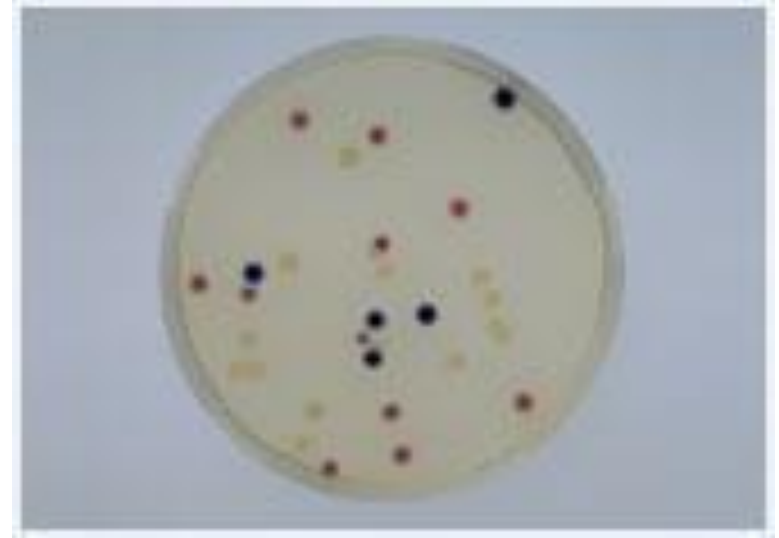
# Классификация

---

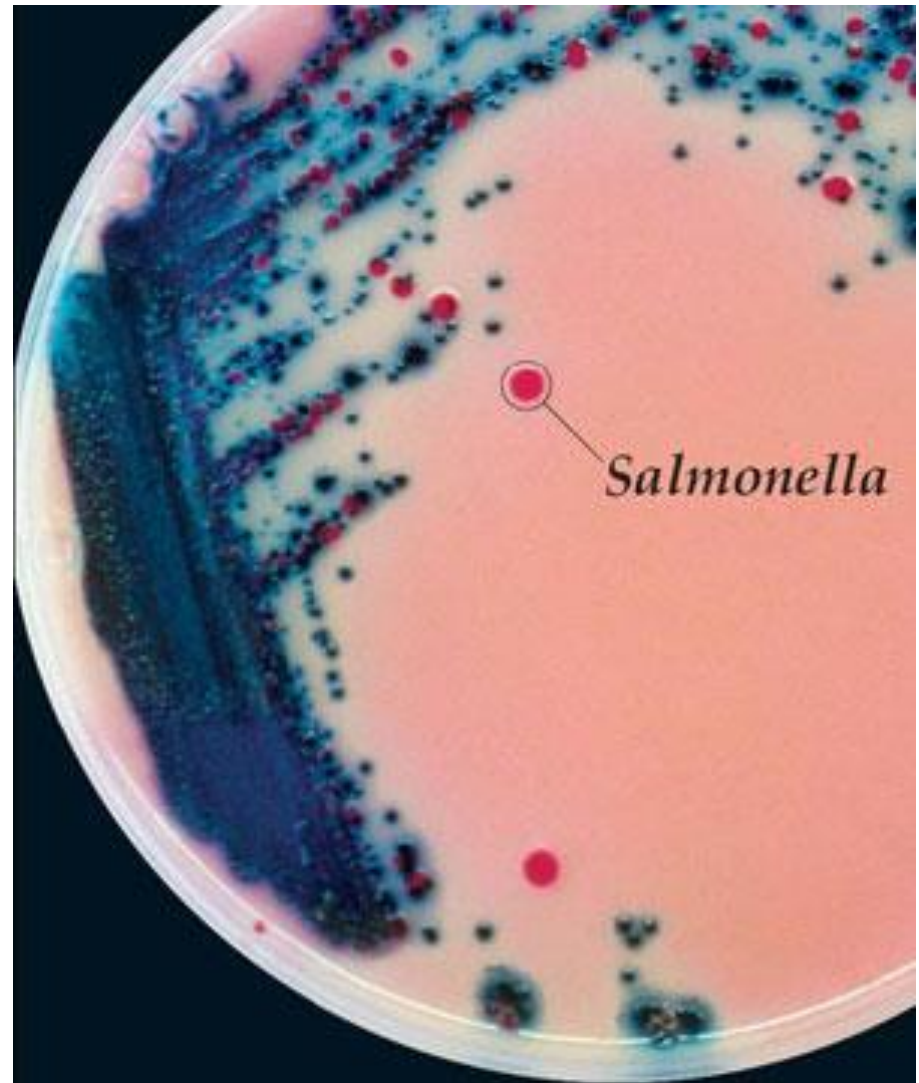
- ▶ По таксономическому уровню различают хромогенные питательные среды
  - Групповой
  - Родовой
  - Видовой
  - Внутривидовой идентификации.
- ▶ По завершенности исследования среды одноэтапной прямой идентификации подразделяют на среды первичной и окончательной идентификации.



Колонии *E. coli* окрашены в цвет от темно-синего до фиолетового; другие колиформные бактерии — от желтовато-розового до красного. Другие грамотрицательные бактерии образуют бесцветные колонии, за исключением некоторых, обладающих  $\beta$ -D-глюкуронидазной активностью и образующих бледно-голубые колонии.



- Колиформные бактерии образуют сине-зеленые колонии, шигеллы и протеи - бесцветные, слегка желтоватые колонии.
- Колонии сальмонелл окрашены в красный цвет.



Питательная среда становится голубовато-зеленой (X-Gal-реакция).

*E. coli*: яркая голубая флуоресценция среды, видимая в УФ-свете (366 нм).



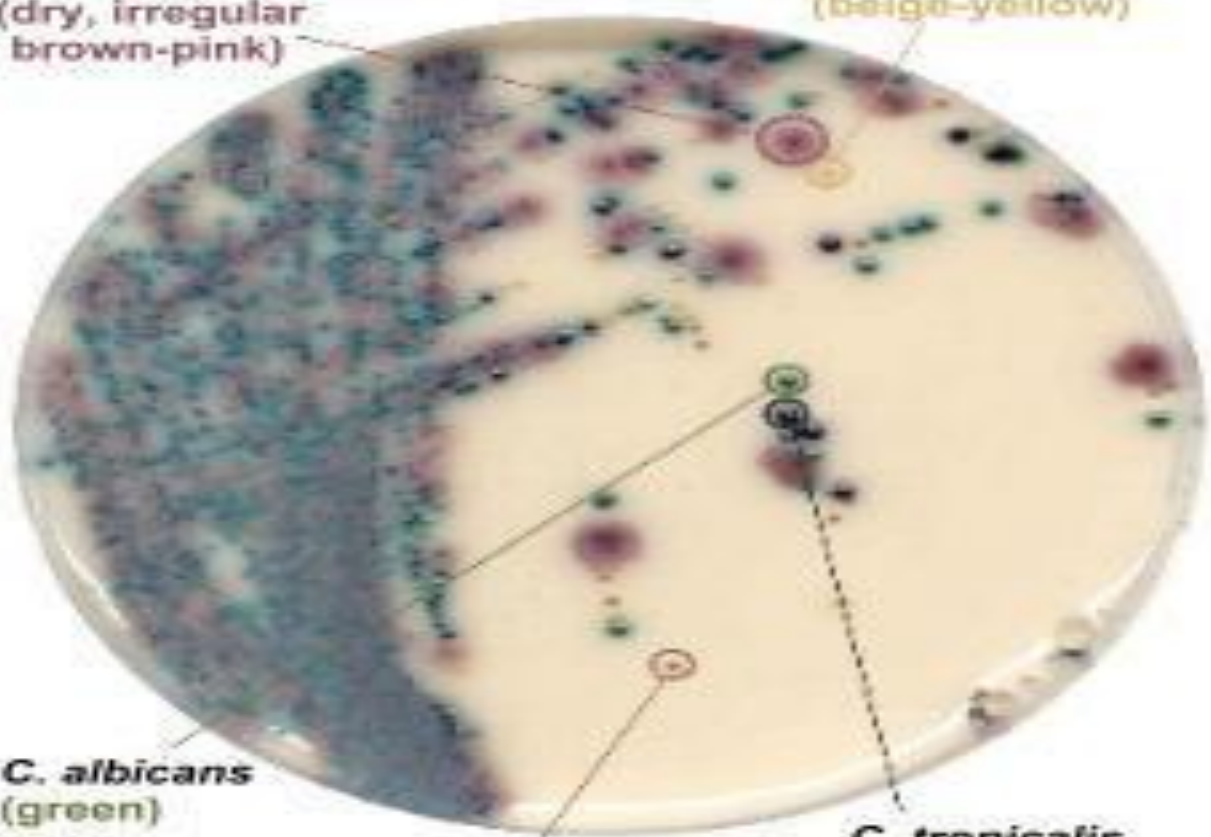
***C. krusei***  
(dry, irregular  
brown-pink)

***C. glabrata***  
(beige-yellow)

***C. albicans***  
(green)

***C. parapsilosis***  
(brown)

***C. tropicalis***  
(dark blue)





# Требования к условиям культивирования бактерий

---

## ▶ Питательные потребности

- ▶ **простые** – растут на универсальных питательных средах
- ▶ **сложные** – растут на специальных питательных средах

## ▶ Температура культивирования

- ▶  $\approx 37^{\circ}\text{C}$  – мезофилы
- ▶  $6 - 20^{\circ}\text{C}$  – психрофилы
- ▶  $50 - 60^{\circ}\text{C}$  – термофилы



# Требования к условиям культивирования бактерий

---

## ▶ Реакция среды (pH)

- ▶ кислая – ацидофилы
- ▶ нейтральная – большинство патогенных бактерий
- ▶ щелочная – алкалифилы

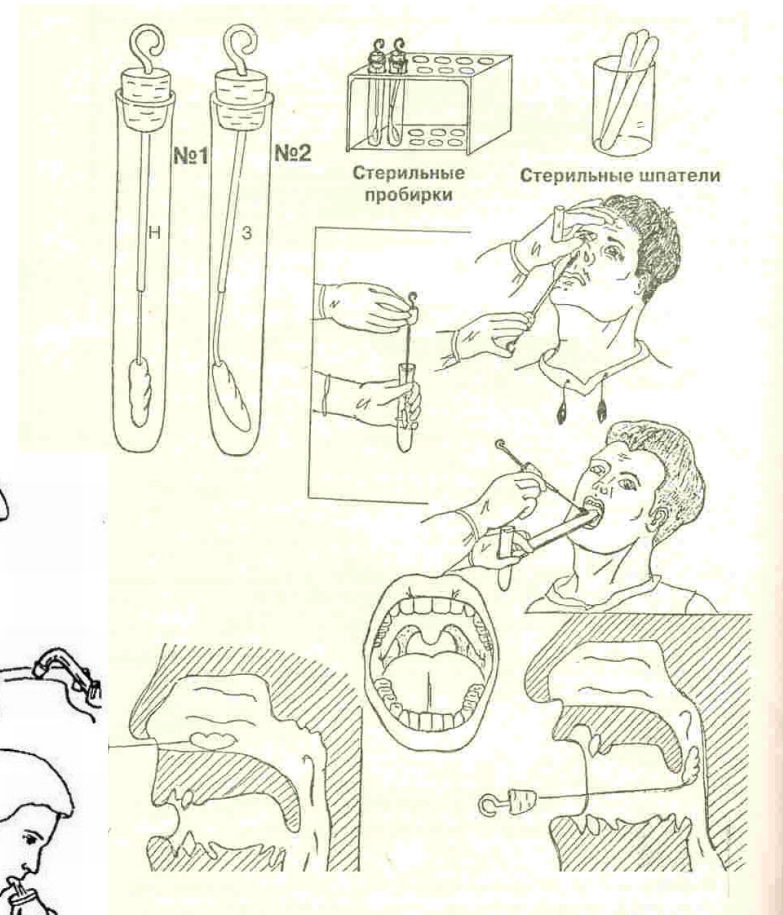
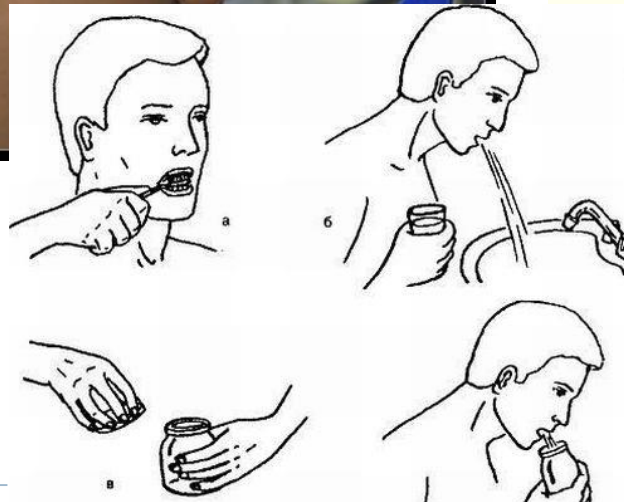
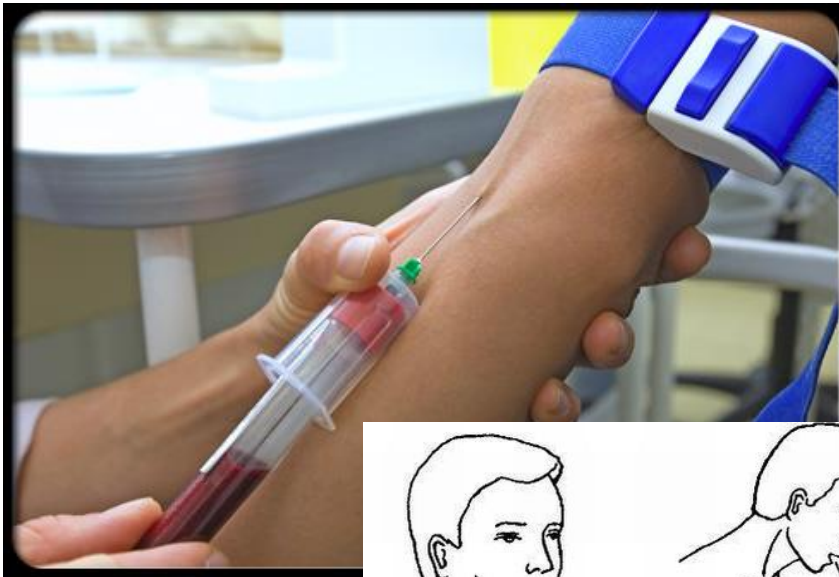
## ▶ Условия аэрации

- ▶ не принимают во внимание – факультативные анаэробы
- ▶ ↓ O<sub>2</sub> – микроаэрофилы
- ▶ ↑ CO<sub>2</sub> – капнофилы
- ▶ без доступа воздуха – анаэробы
- ▶ с обязательным доступом воздуха – облигатные аэробы



# Забор материала

➔ Выбор материала зависит от локализации инфекции!



# Транспортировка материала

- ▶ Не более 2 часов!
- ▶ При использовании транспортных сред - 6 часов!



- 
- ▶ Выделение чистой культуры бактерий – обязательный этап бактериологического исследования в лабораторной диагностике.



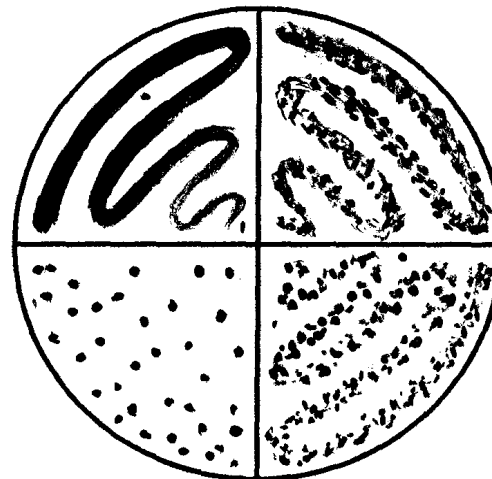
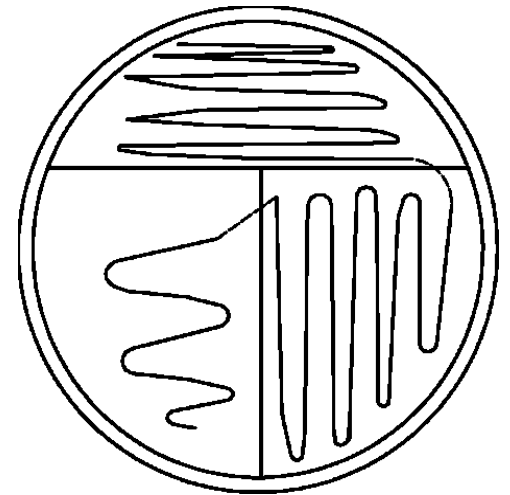
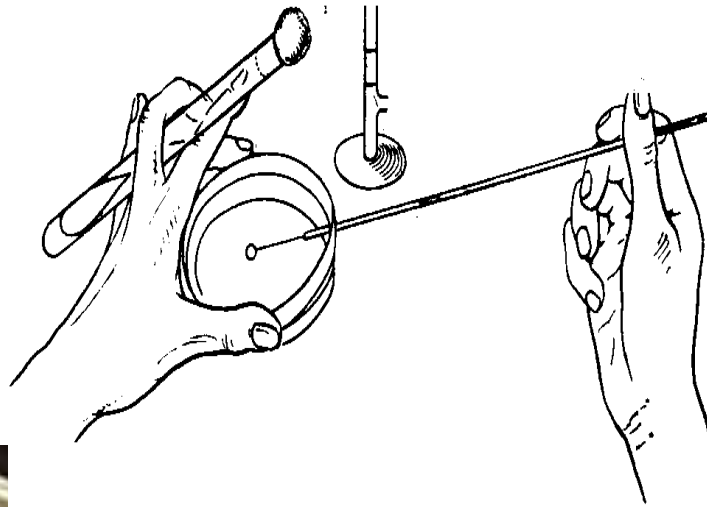
# 1-й ЭТАП



Рассев исследуемого материала по поверхности плотной питательной среды с целью получения изолированных колоний. Может включать предварительную микроскопию исследуемого материала



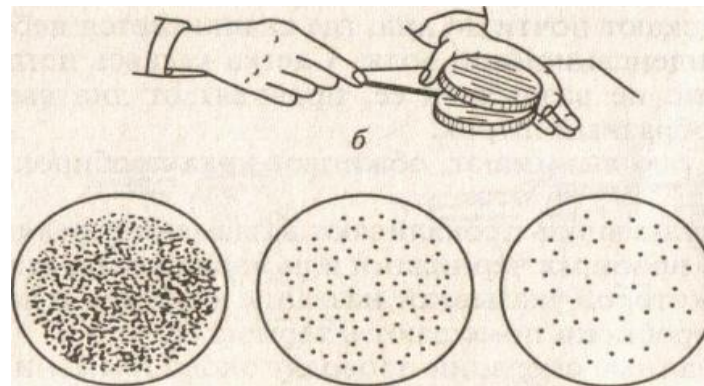
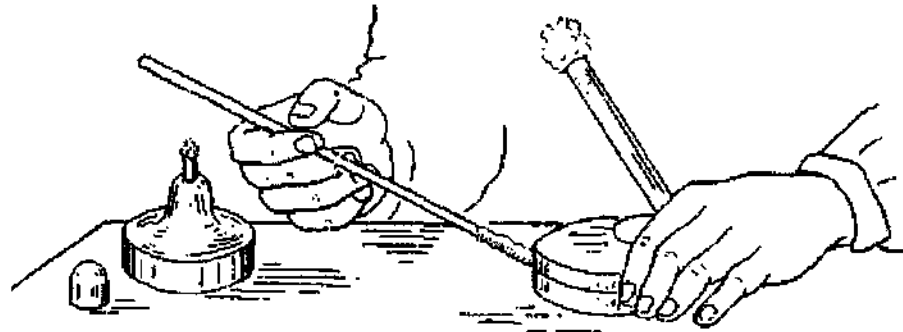
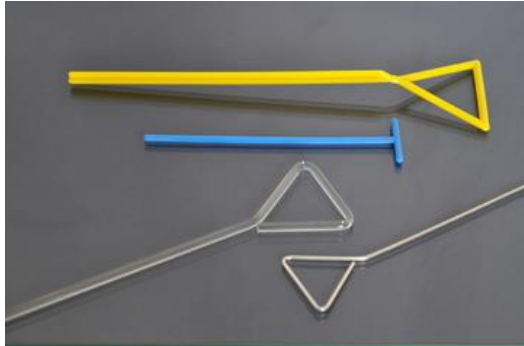
# Техника посева микроорганизмов бактериологической петлей



1  
1  
1  
1  
1  
1  
1  
1  
1  
1

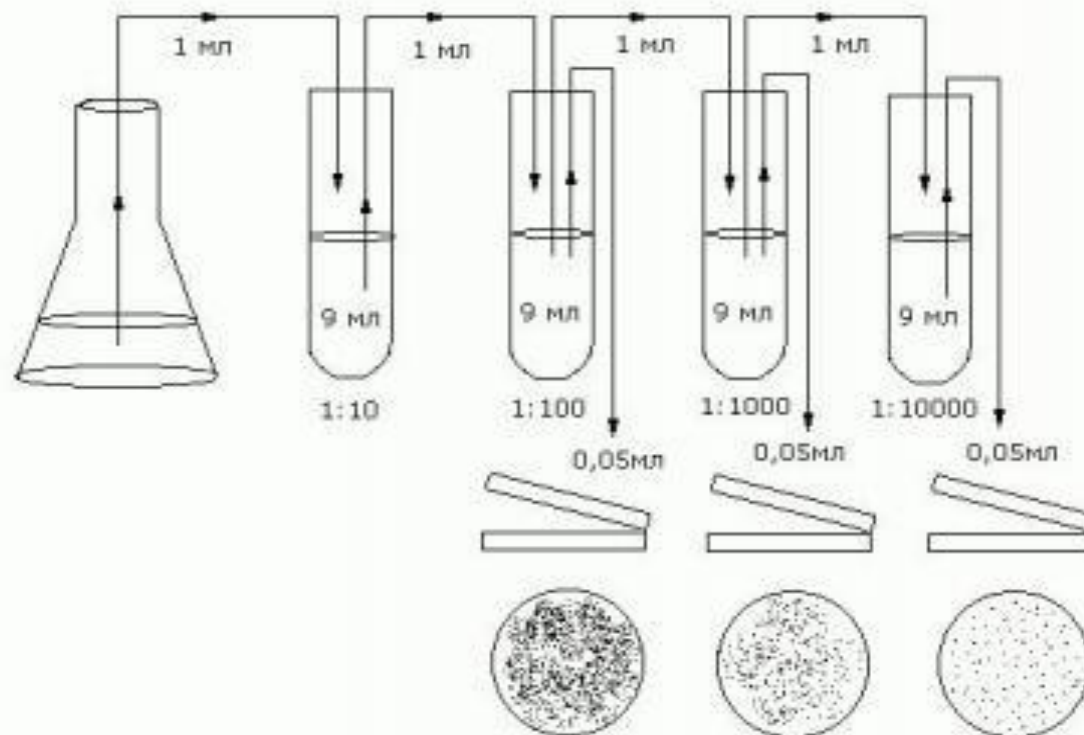
# Техника посева шпателем

---





# Техника посева. Метод серийных разведений.



# Культивирование в термостате

---



## 2-й этап.

- ▶ Макро- и микроскопическое изучение выросших колоний и отсева колонии, характерной для определенного вида и пересев на скошенный агар или чашку Петри со свежим агаром для **получения чистой культуры.**



---

**Чистая культура (или аксеничная культура) —**  
совокупность микроорганизмов одного вида,  
имеющие одинаковые  
морфологические, биохимические и культуральные  
свойства.



## 2 этап

---

### 3. Изучение колоний



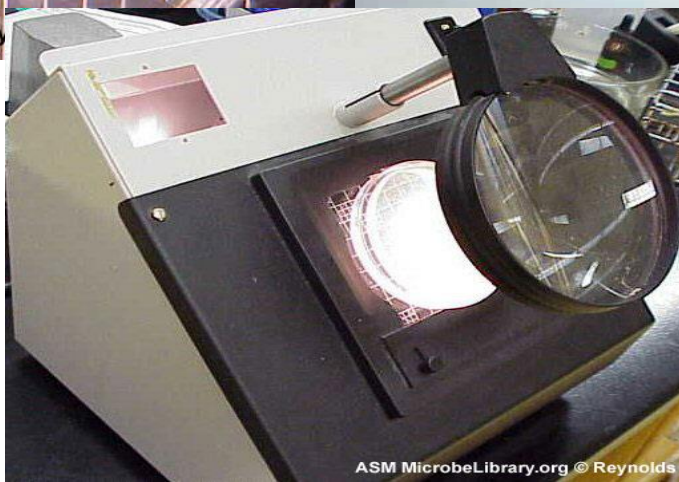
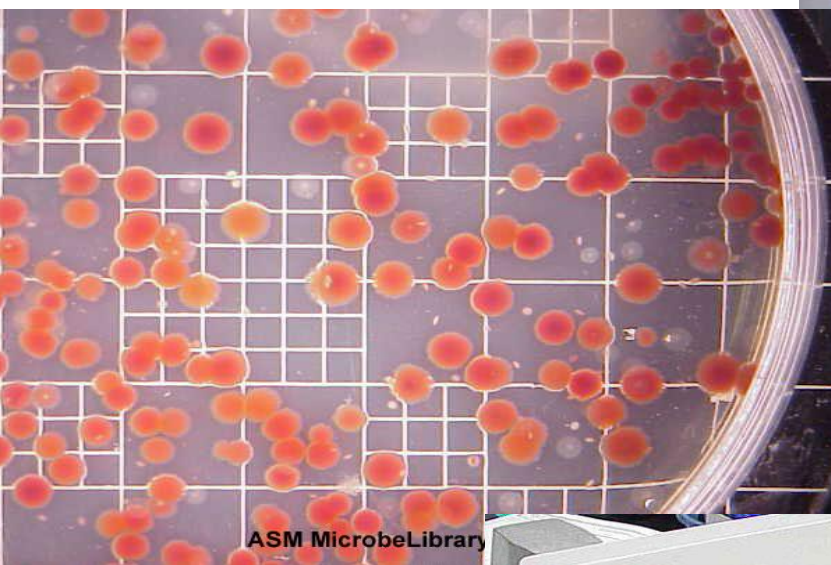
Колонии кишечной палочки  
на плотной питательной среде

Посев на скошенный  
питательный агар  
для выделения чистой культуры.



Рост на нитратном питательном агаре (M072), слева направо:  
1. *Acinetobacter calcoaceticus*  
2. *Escherichia coli*  
3. Контроль (незасеянная среда)

По результатам посева серийных разведений исследуемого материала выбирают чашку Петри, удобную для подсчета колоний.



Подсчет колоний



# 3-й этап Идентификация

---

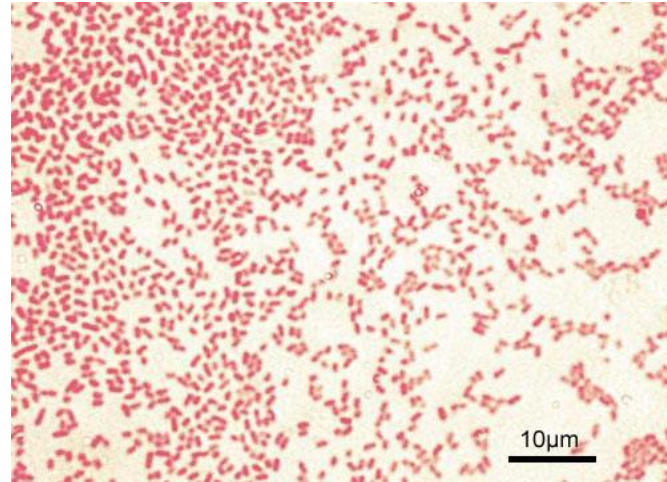
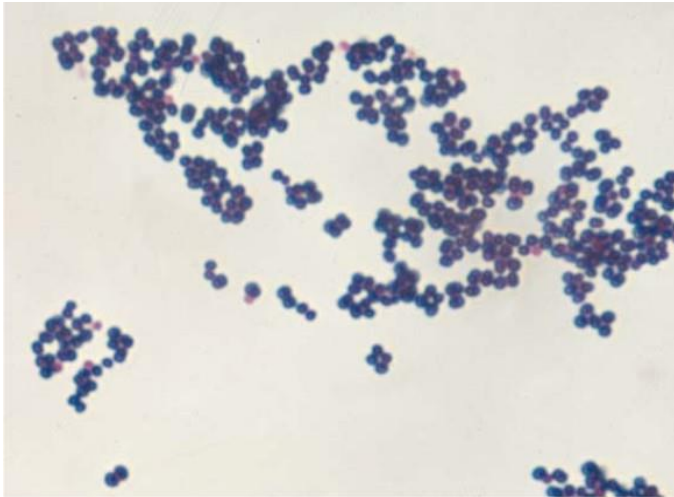
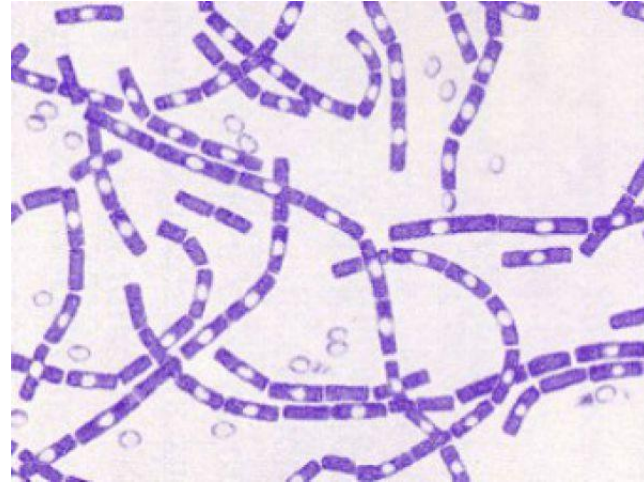
Цель – идентификация- определение вида – выделенной чистой культуры по комплексу биологических свойств:

- Морфологических
  - Тинкториальных
  - Культуральных
  - Биохимических
  - Антигенных
  - Токсигенных
  - Чувствительности к антибиотикам и др. лекарственным препаратам
  - Чувствительности к типовым диагностическим фагам
- 



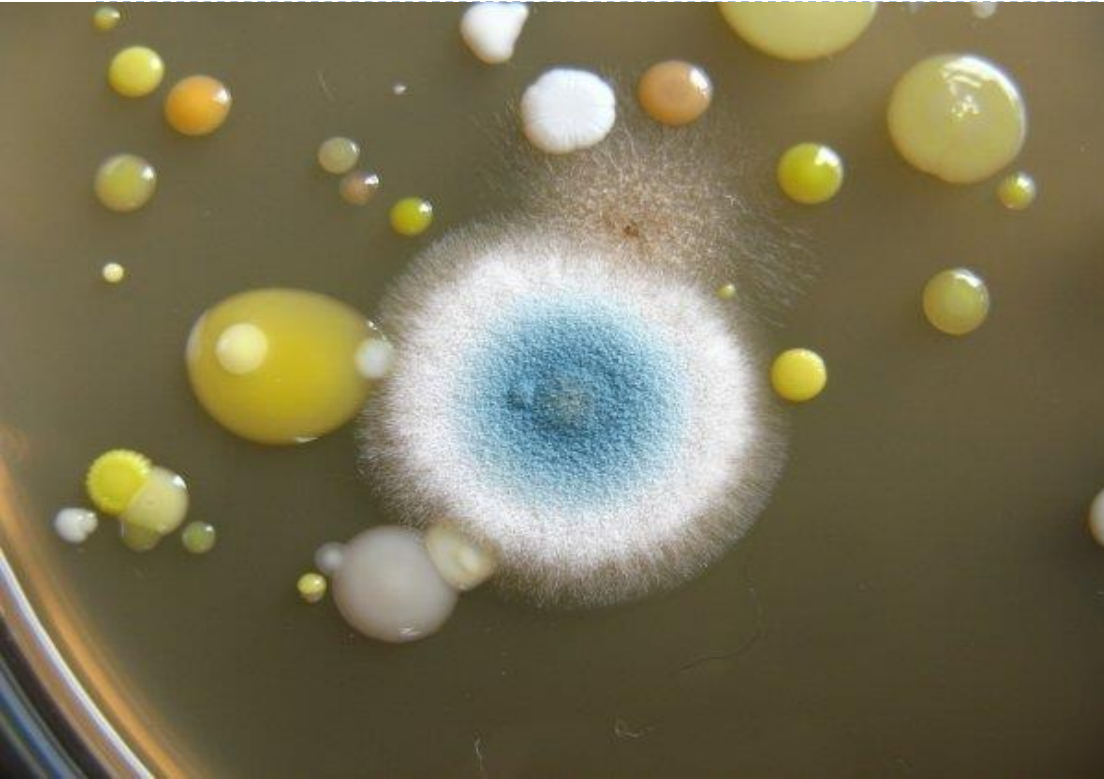
# Изучение морфологических, тинкториальных свойств

---



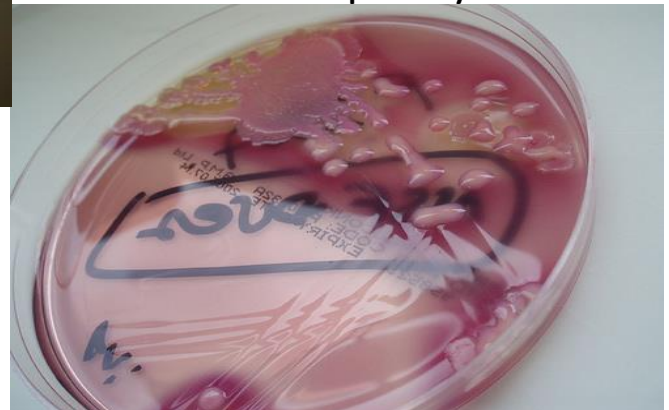


# Изучение культуральных свойств бактерий



Streptomyces

Рост изолированных колоний

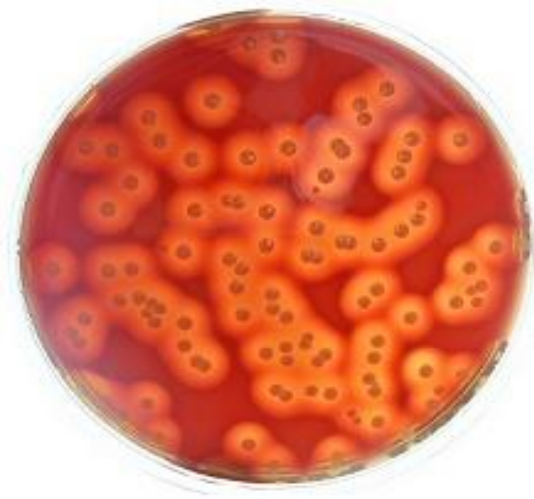


Klebsiella pneumoniae

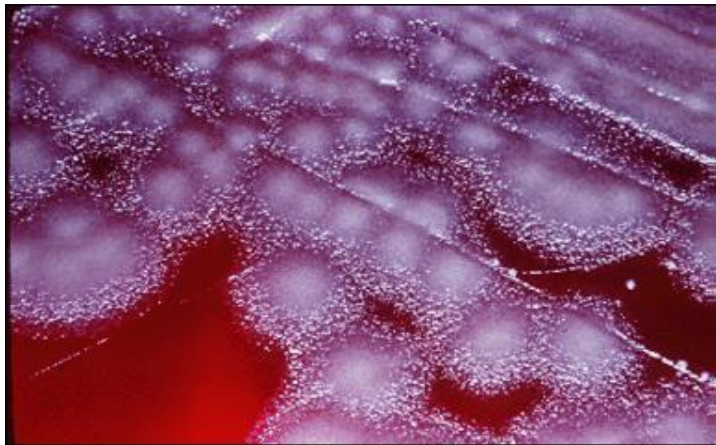


## Культуральные свойства бактерий (продолжение)

---



*S.aureus* на кровяном агаре



Колонии *Bacillus anthracis*  
«голова медузы»



Фото К.Лавров lavrov.ko@gmail.com

Колонии возбудителя чумы *Y.pestis*  
«кружевной платочек»

---

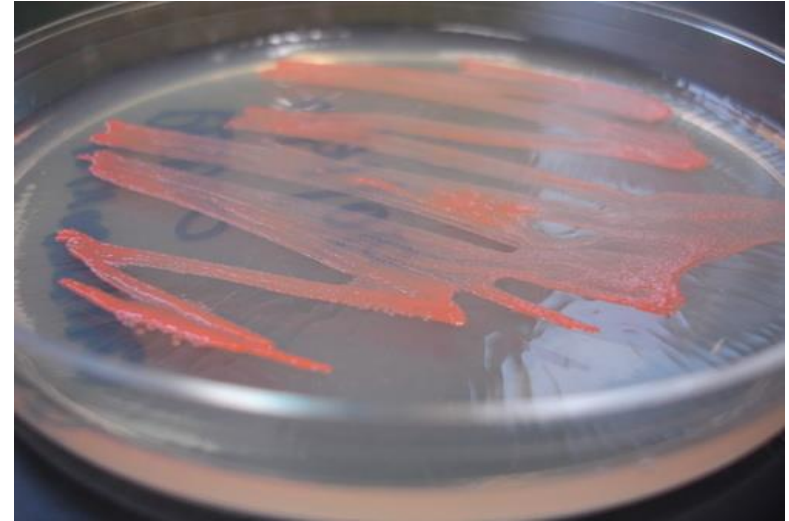


- Культуральные свойства бактерий.  
Пигменты.

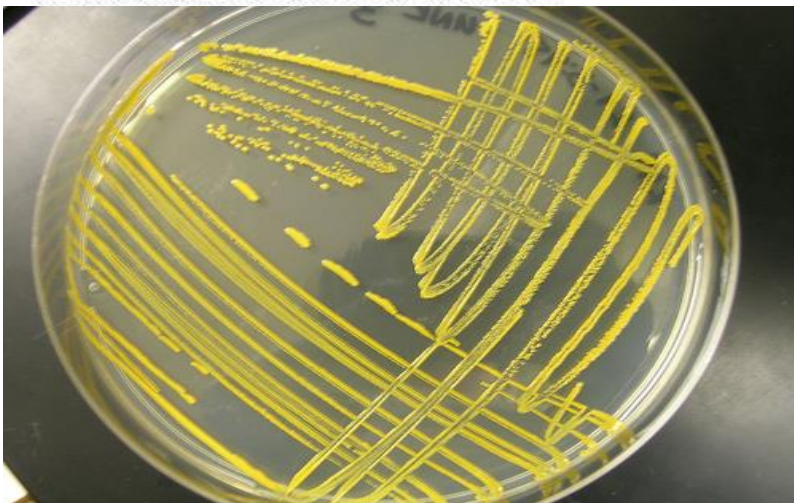
---



Рост колоний синегнойной палочки.



Рост чистой культуры *Micrococcus roseus*.



Рост чистой культуры *S. aureus*

---

# Изучение ферментативной активности.

---

- ▶ Биохимическая идентификация выделенной чистой культуры заключается в определении спектра ее ферментативной активности



# Идентификация микробов



Рост на трехсахарном железосодержащем агаре, слева направо:

1. Контроль (незасеянная среда)
2. 2. *Salmonella* серовара *Typhimurium*
3. 3. *Escherichia coli*
4. 4. *Shigella flexneri*
5. 5. *Salmonella* серовара *Typhi*

Для идентификации микроорганизмов используется их способность ферментировать углеводы, изменяя цвет среды и образовывать сероводород

# Изучение ферментативной активности бактерий при помощи биохимического анализатора

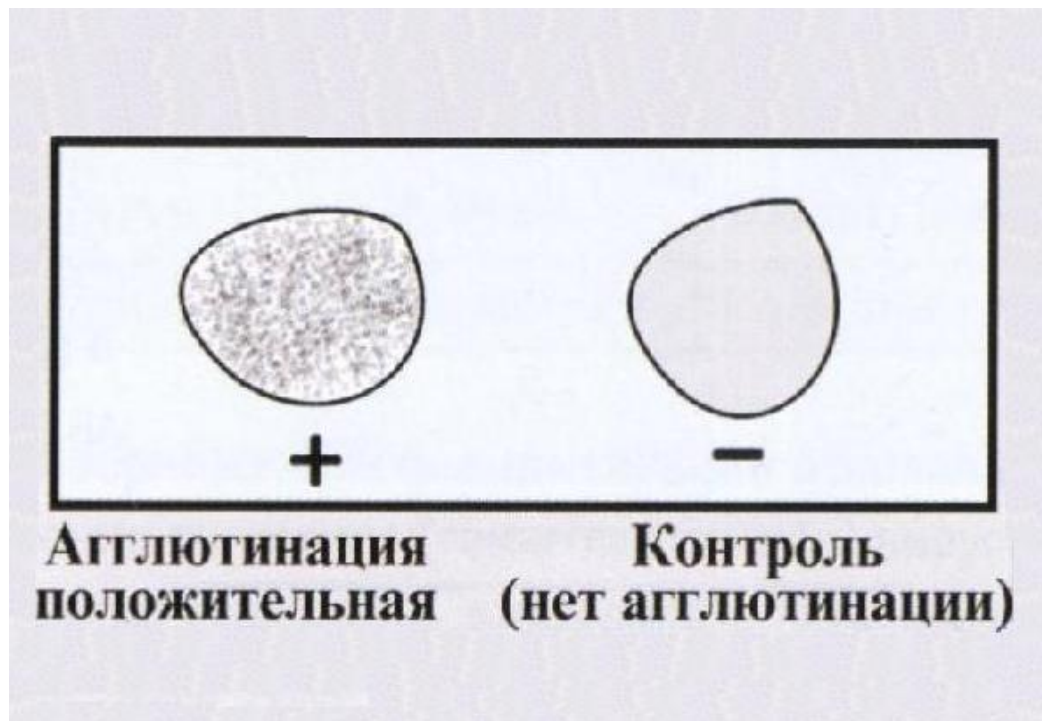
---



# Изучение антигенных свойств

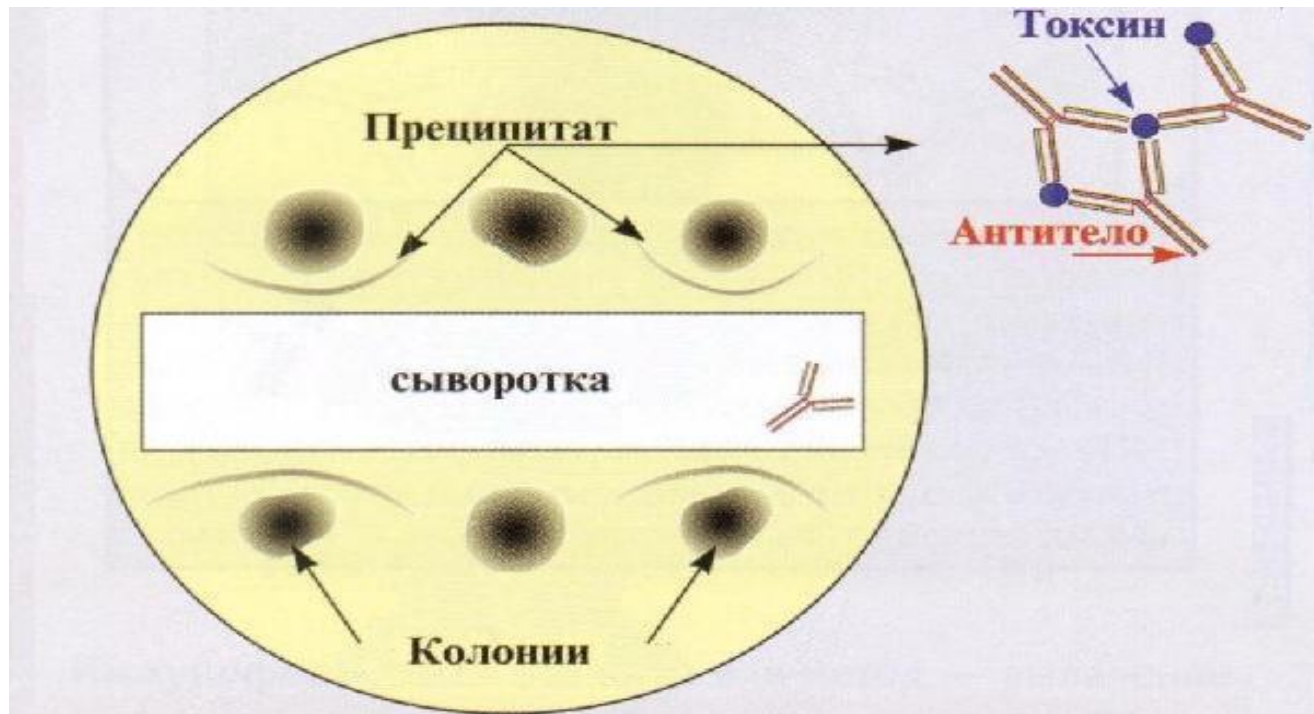
---

- ▶ Постановка серологических реакций (реакция агглютинации на стекле)



# Определение токсигенности

- ▶ Постановка серологических реакций (Преципитация в геле по Оухтерлони)

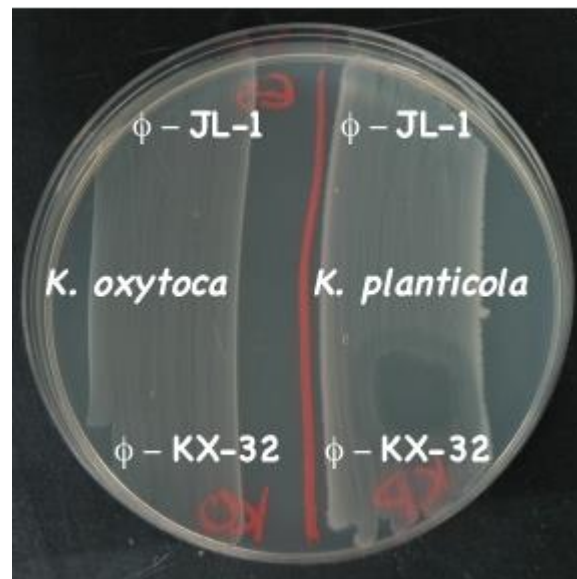




# Фаготипирование

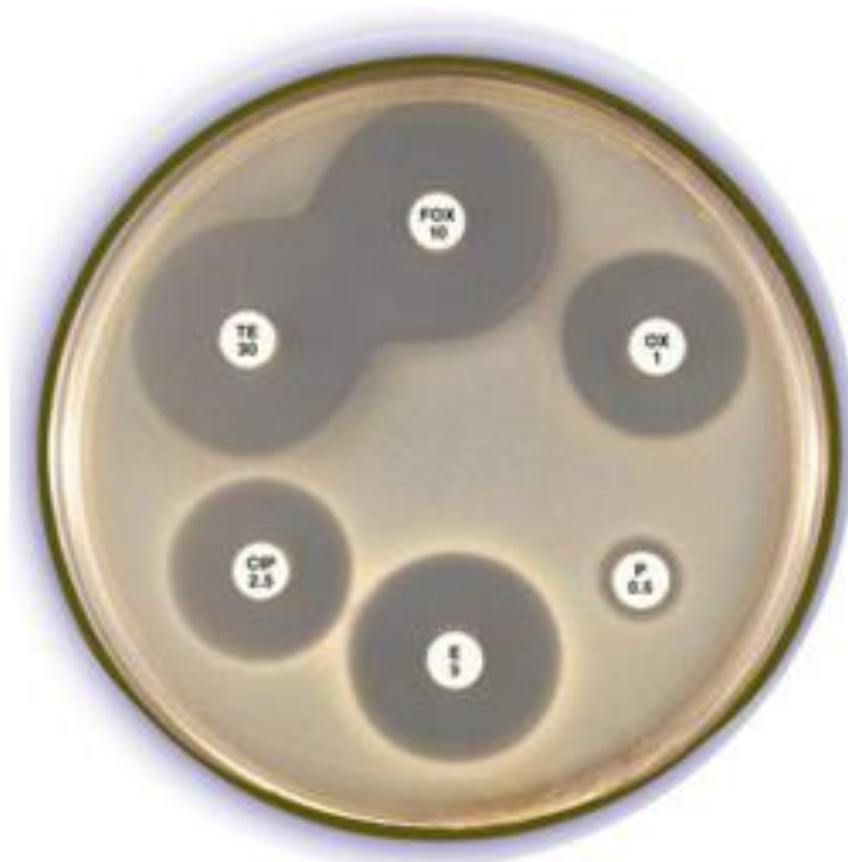
---

- ▶ Определение видовой принадлежности по видовому бактериофагу



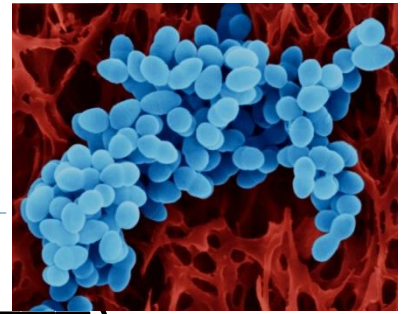
# Определение чувствительности к антибиотикам

---



# Заключение

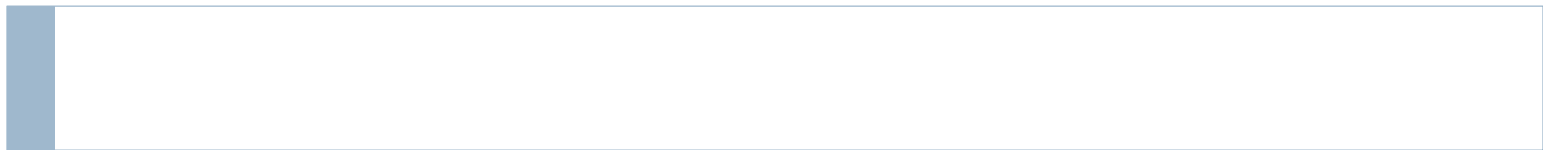
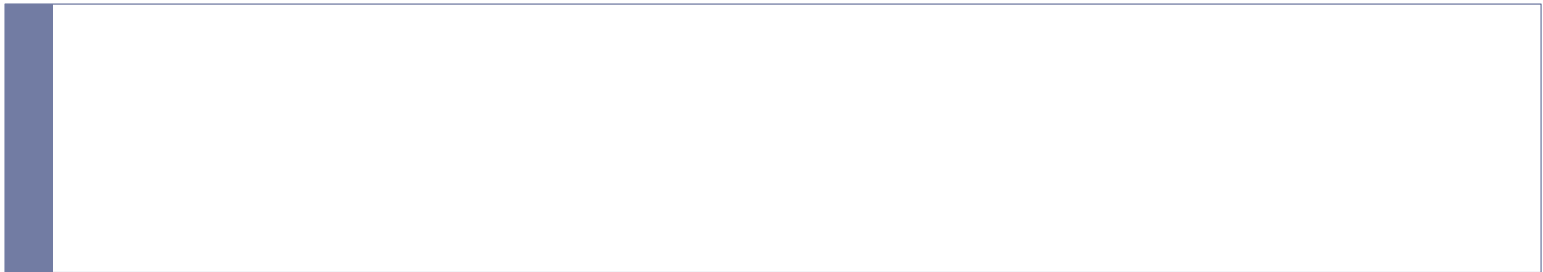
---



- ▶ В исследуемом материале выявлен \_\_\_\_\_ (указанием вида и рода)
- ▶ Типичный по свойствам
- ▶ В количестве \_\_\_\_\_ КОЕ\мл(г)
- ▶ Чувствительный к бактериофагу \_\_\_\_\_
- ▶ Чувствительный к антибиотикам \_\_\_\_\_



# Молекулярно-генетические методы диагностики

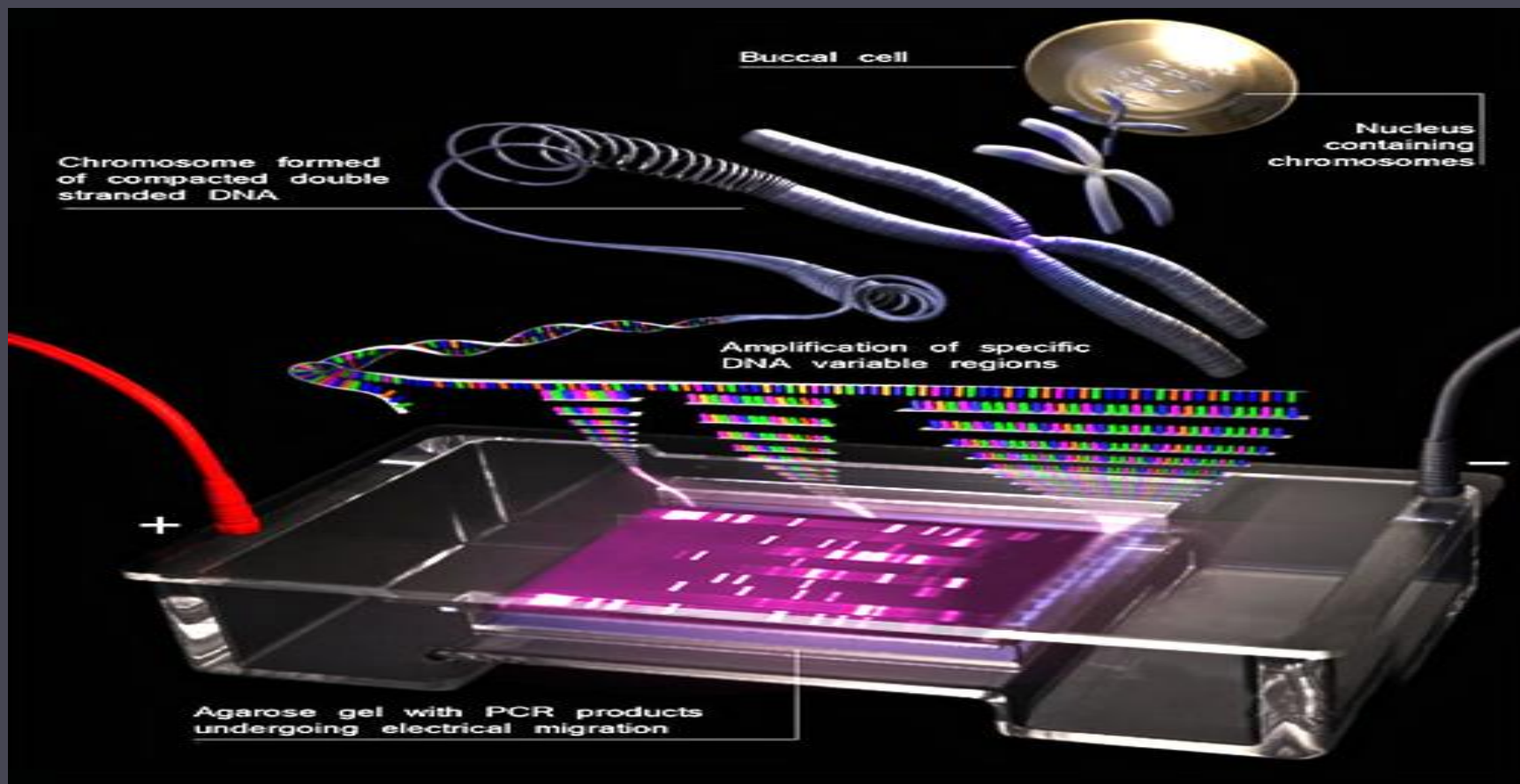


---

Под **молекулярно-генетическими методами** диагностики инфекционных заболеваний следует понимать методы, позволяющие обнаруживать ДНК или РНК возбудителя в исследуемом материале.

К таким методам относятся молекулярная гибридизация и полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR).





ПЦР

- Полимеразно-цепную реакцию (**ПЦР, PCR**) изобрел в 1983 году американский ученый Кэри Мюллис (Kary Mullis).
- Принцип метода заключается в удвоении (амплификации) участка ДНК, ограниченного праймерами, при помощи фермента ДНК-полимеразы.
- За каждый следующий цикл амплификации происходит удвоение как исходного участка ДНК, так и вновь синтезированных фрагментов (амплификатов).
- В результате этого число фрагментов растет в геометрической прогрессии (цепная реакция). После 30 - 40 циклов их число превышает несколько миллиардов, что делает возможным их обнаружение различными методами.



- **Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:**

- 
- Определяемая ДНК (РНК) инфекционного агента в испытуемом биологическом материале.
  - *Праймеры* двух типов (олигонуклеотиды) – короткие цепочки ДНК с нуклеотидной последовательностью, комплиментарной 3' концам каждой из двух цепей определяемой ДНК. Праймеры получают *in vitro* химическим синтезом.
  - Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК (достройку комплиментарных цепей).
  - Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
  - Ионы  $Mg^{2+}$ , необходимые для работы полимеразы.
  - Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора.
- 

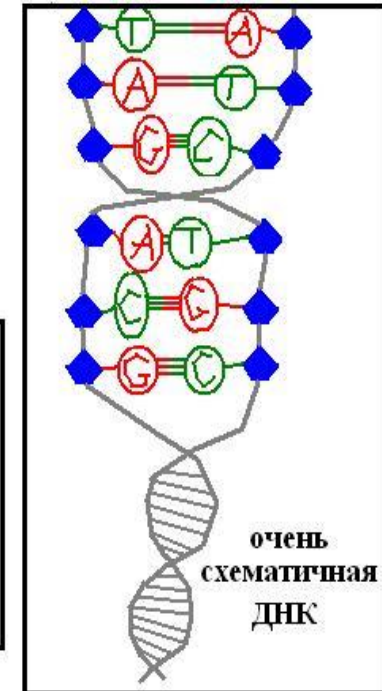
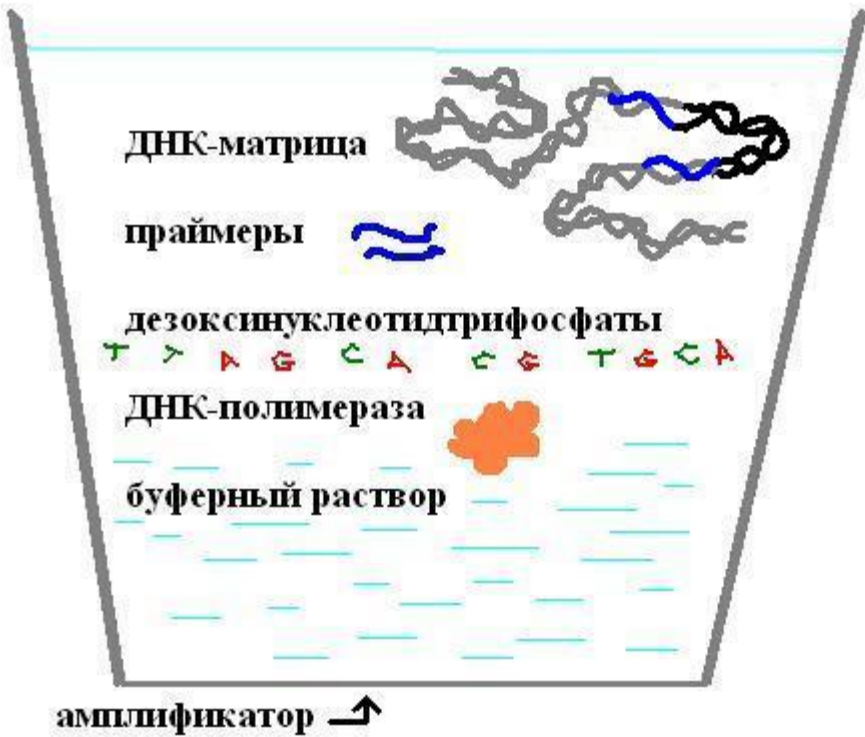




## • Стадии ПЦР

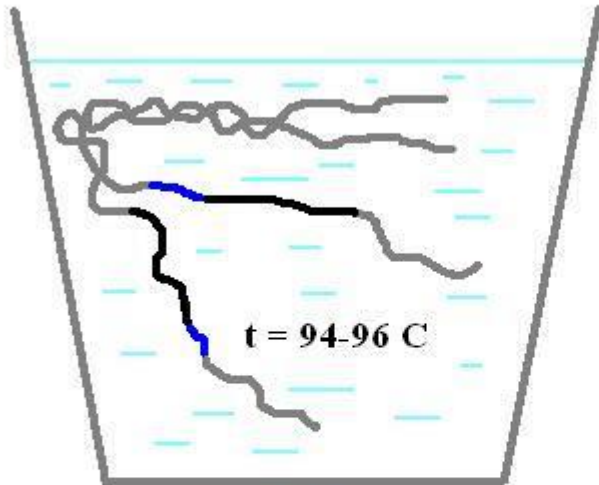
- **1. Выделение нуклеиновых кислот.** На первом этапе выделяется вся ДНК или РНК из исследуемого материала.
- **2. Собственно ПЦР или амплификация.** В раствор, содержащий смесь нуклеотидов, ПЦР-буфер, полимеразу и праймеры добавляется ДНК, выделенная на первом этапе. Амплификацию проводят в три этапа: денатурация, отжиг, элонгация.
- Сначала реакцию смесь нагревают до 90-94° С, вызывая этим **Денатурацию** - расплетение цепей двунитевой ДНК. Затем температуру снижают до 50-70° С и при этом начинается **присоединение (отжиг) праймеров**. Праймеры специфично (по принципу комплементарного спаривания) присоединяются к коротким участкам. Далее следует стадия **элонгации** (дистраивание праймеров), начиная с 3'-концов, путём комплементарного синтеза на матрицах одноцепочечных фрагментов ДНК.
- Затем цикл повторяется. Таким образом, при повторении этих циклов количество копий участка ДНК, находящегося между местами посадки праймеров, возрастает в геометрической прогрессии.
- **3. Учет результатов.** Накопленные продукты амплификации (большое число копий ДНК между местами посадки праймеров) можно выявить путем электрофореза в геле.





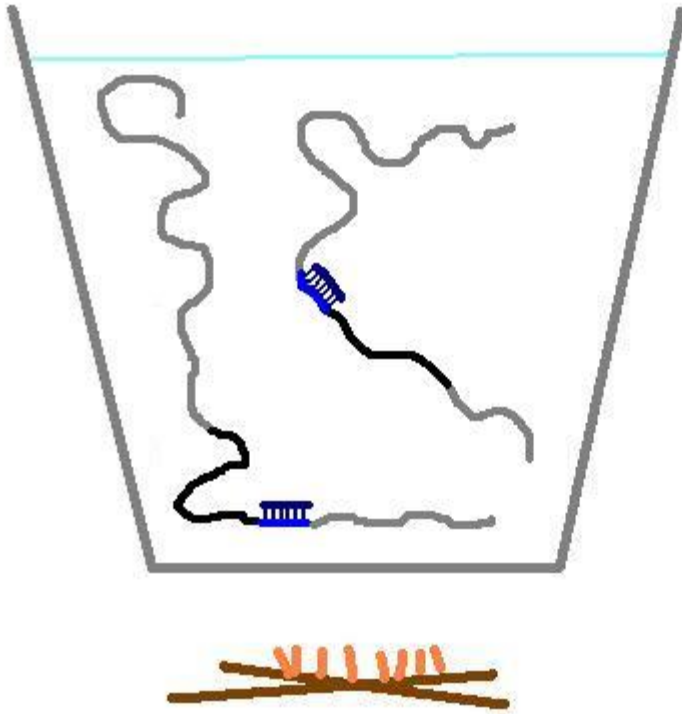
- ▶ Для того, чтобы выявить и размножить в имеющейся пробе именно ту последовательность ДНК, которая необходима, нужно знать нуклеотидные последовательности ее концов, для того, чтобы создать к ним комплементарные короткие (18-30 нуклеотидов) фрагменты - праймеры. На рисунке эти известные концы последовательности отмечены синим, а черным - тот фрагмент ДНК, который нужен.

## Первая стадия - денатурация



Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96 °С (или до 98 °С, если используется особенно термостабильная полимераза) на 0,5—2 мин., чтобы цепи ДНК разошлись.





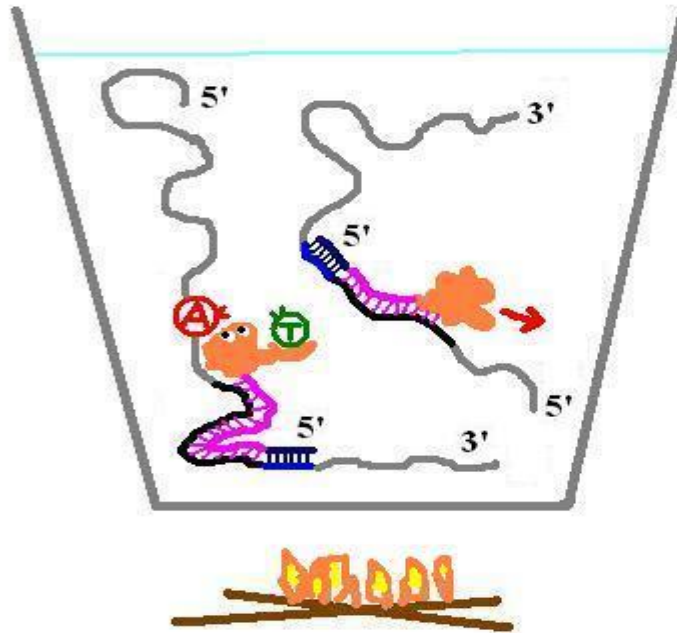
## Вторая стадия - отжиг.

Температуру снижают, и праймеры соединяются. Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей с комплементарными им участками ДНК. Эта стадия называется *отжигом*. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 4—5°С ниже их температуры плавления. Время стадии — 0,5—2 мин. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).

Главный элемент PCR - это многократный тепловой цикл, при котором образец ДНК подвергается воздействию трёх различных температур.

# Третья стадия - элонгация

---

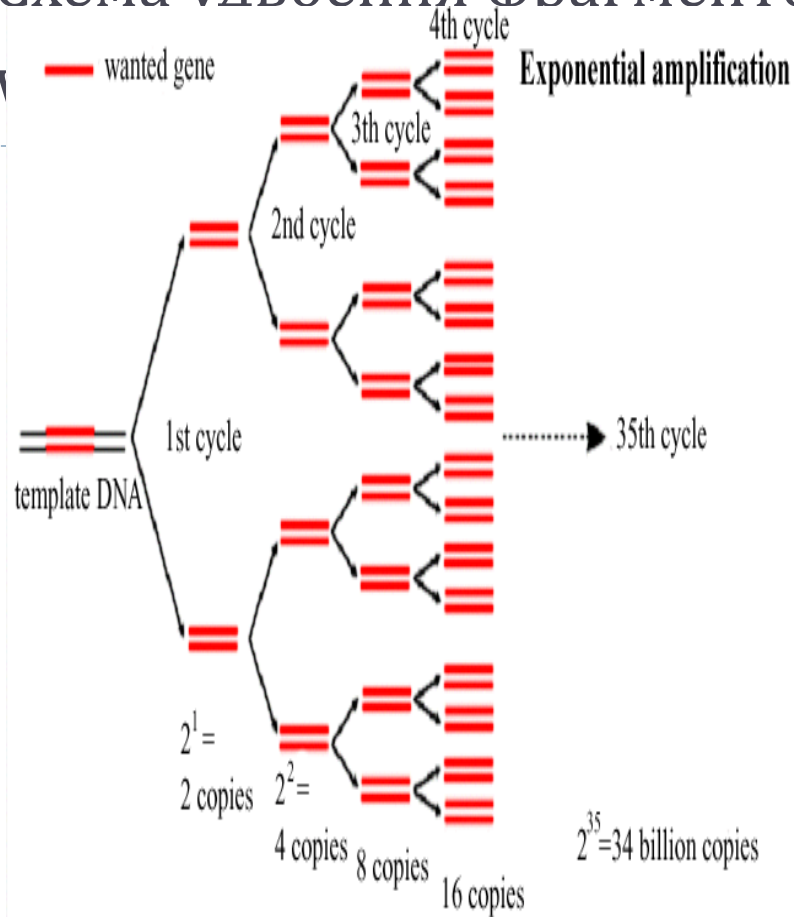


Часто используемые  
полимеразы Taq и Pfu  
наиболее активны при 72 °C

Полимераза - это фермент, умеющий достраивать вторую цепь ДНК. Для того, чтобы начать это делать, ей нужен кусочек, где ДНК уже двуцепочечная, в этом качестве и выступает место взаимодействия ДНК с праймером. Полимераза всегда достраивает цепь от 5' к 3'-концу (эти названия связаны с ориентацией сахара дезоксирибозы в цепи; в обычной двуцепочечной ДНК цепи направлены противоположно друг другу:

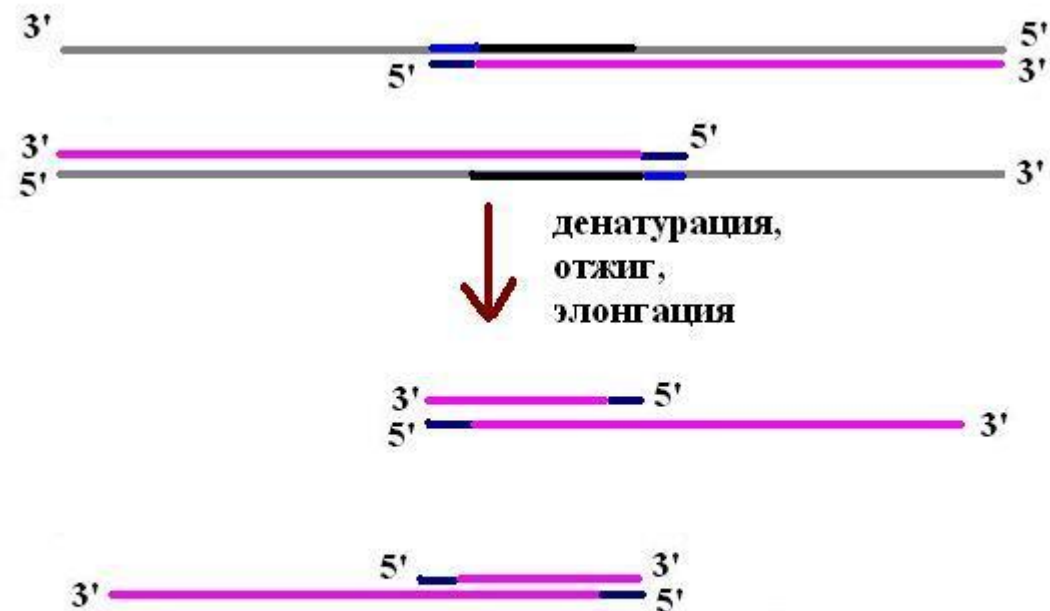


# Схема удвоения фрагментов ДНК в ПЦР (Andy)



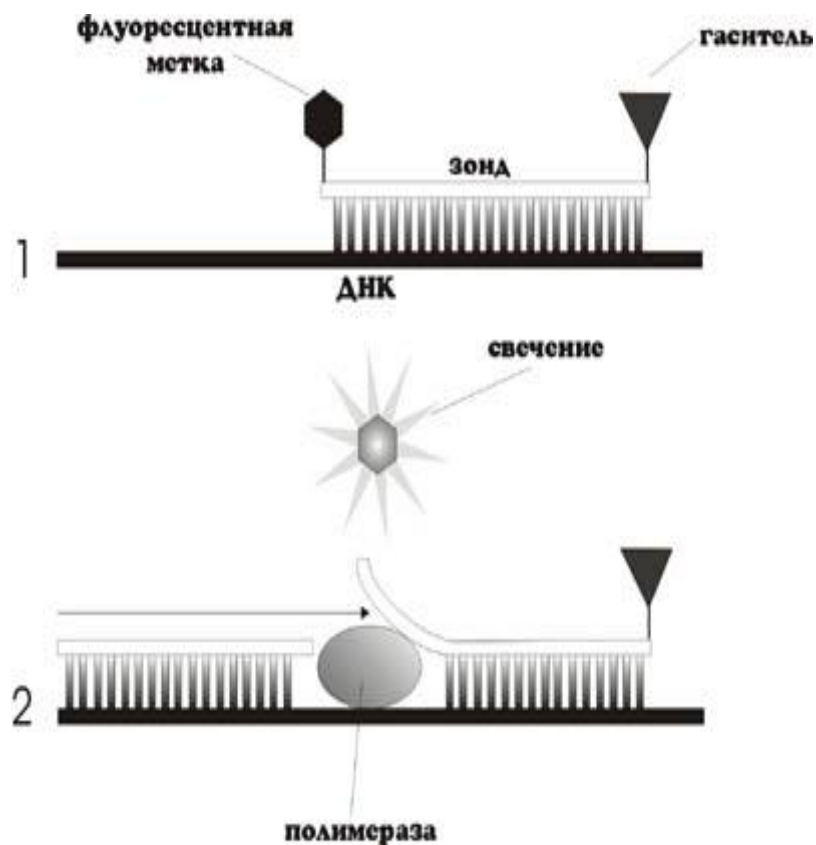
- ▶ Для процесса амплификации необходимо, чтобы структура праймеров была идентична (комплементарна) участку исходной ДНК. Если этого не происходит (отсутствует специфическая ДНК), то удвоения ДНК не происходит. Если в растворе не окажется ни одной молекулы ДНК с участком, комплементарным внесенным праймерам, то реакция ПЦР не пойдет, даже несмотря на то, что в растворе будет плавать миллион других молекул ДНК. Этим и обусловлена высокая специфичность метода ПЦР.

- ▶ Теперь в растворе есть четыре слишком длинных цепи ДНК. Две - те, которые были, и две построенные по праймерам. Но если повторить процесс ещё раз, то получится следующая картина:



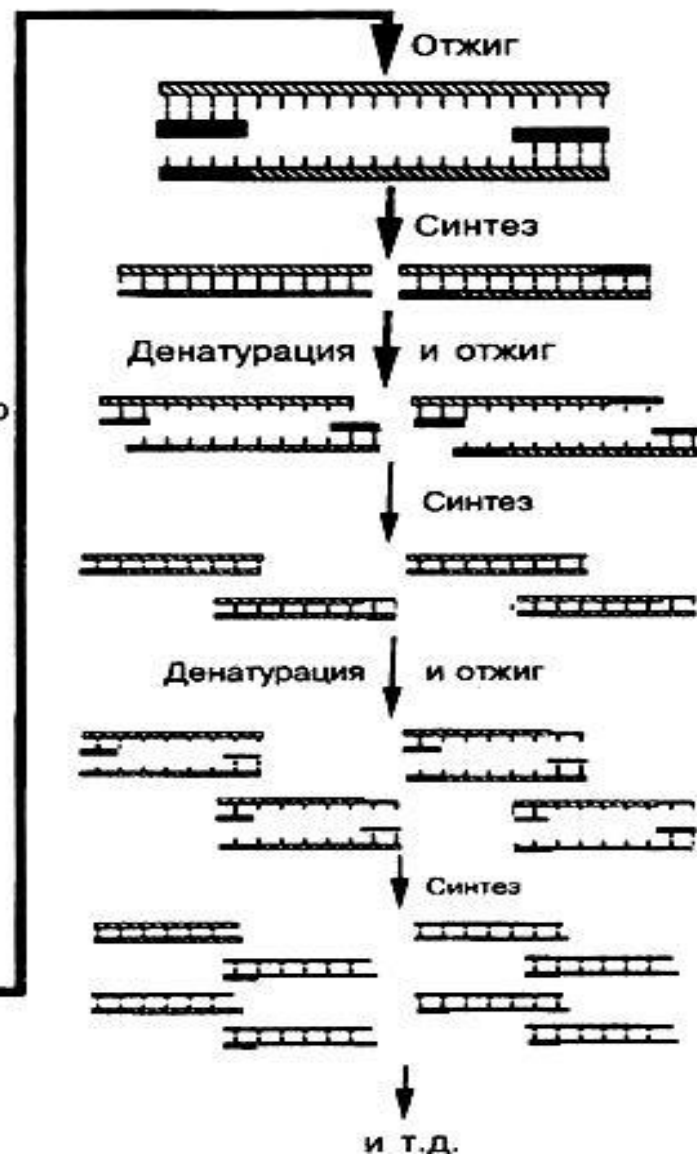
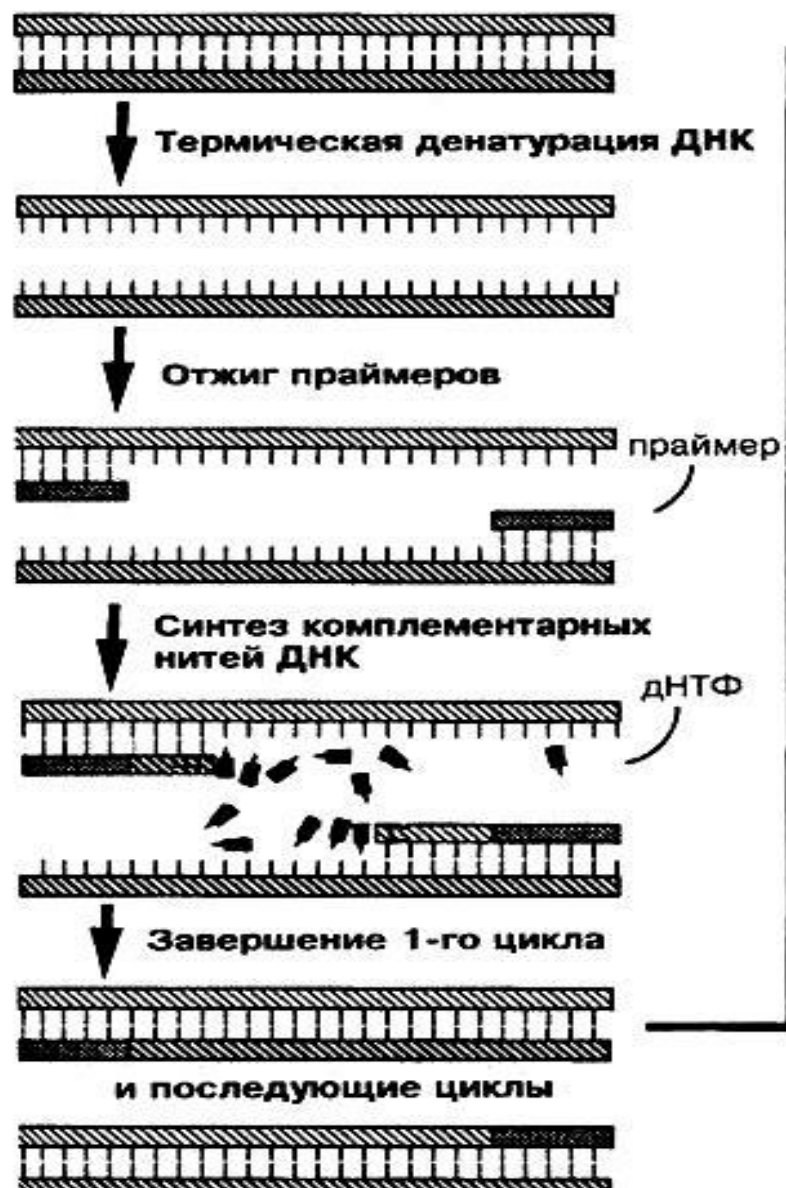
Если изначальные цепи ДНК можно было считать условно бесконечными в обе стороны, то нити, полученные в первом цикле, бесконечны в одну сторону, а со второй ограничены праймером. Когда такие цепи будут взаимодействовать со вторым праймером, будут получаться кусочки, ограниченные с двух сторон. Всего в ПЦР проводят несколько десятков циклов, поэтому абсолютное большинство продукта реакции будет представлять собой короткие нужные последовательности, с которыми уже можно будет производить различные манипуляции, в простейшем случае - разгонять на хроматографе и сравнивать полученные полоски с теми, которые должны были бы получиться, если бы была уреаплазма или кто-то другой.

## Четвертая стадия - детекция.



- В начале у нас был раствор с небольшим количеством длинных, полноценных клеточных молекул ДНК.
- В конце ПЦР мы имеем раствор с огромным количеством размноженных нужных участков, кусочков ДНК
- Раствор наносят на гель, к гелю прикладывают напряжение. За часок-другой кусочки молекул ДНК (они имеют заряд) перемещаются в геле на расстояние, пропорциональное их массе.
- Гель кладут под ультрафиолет и масса одинаковых кусочков ДНК начинает светиться в том месте геля, где собралась.
- Если собралась — значит в ДНК был участок, соответствующий праймеру, нужный «ген». Если ничего не светится, мутная полоска без четкого участка — значит, нужного участка в ДНК нет.



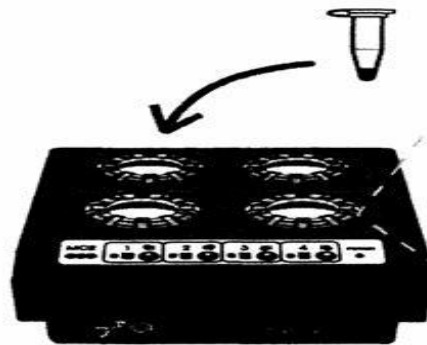


## Стадии метода ПЦР

### 1. Выделение ДНК



### 2. Амплификация



### 3. Детекция в агарозном геле

отрицательный контроль

положительный контроль



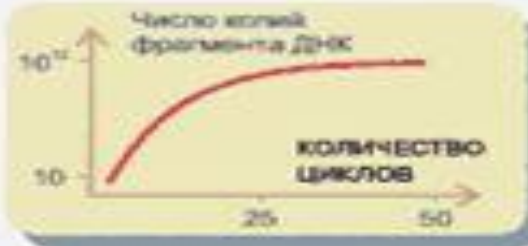
положительные образцы

отрицательные образцы

### 1. Выделение ДНК



### 2. Амплификация



### 3. Детекция в агарозном геле

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ



ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ ОБРАЗЦЫ

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ ОБРАЗЦЫ

- **Достоинства ПЦР**
- **1. Универсальность.** При помощи ПЦР можно определять ДНК в любых биологических образцах. Причем это в равной степени относится как к ДНК микроорганизмов, так и к ДНК человека.
- **2. Высокая специфичность.** Специфичность определяется тем, что в ПЦР определяется уникальный участок гена, характерный только для данного возбудителя. В зависимости от выбранных праймеров ПЦР-тест-система может дифференцировать роды, виды, серотипы и даже патогенные и непатогенные штаммы микроорганизмов одного вида.
- **3. Высокая чувствительность.** Полимеразная цепная реакция способна выявлять единичные копии ДНК. В среднем порог чувствительности большинства современных тест-систем составляет от 10 до 100 копий ДНК. Это значительно превышает чувствительность культуральных методов исследования.
- **4. Малый объем биологического материала.** Проведение анализа возможно в минимальном объеме пробы (до нескольких микролитров), что крайне важно в педиатрии, неонатологии, неврологии, судебной медицине.
- **5. Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций.** Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях.
- **6. Возможность осуществлять раннюю диагностику заболеваний** - максимальное время проведения исследования 48 часов.



- ПЦР в режиме реального времени (real-time PCR, мониторинговая ПЦР, ПЦР-РВ) – это метод, при котором этапы амплификации ДНК мишени и детекция образующихся продуктов происходят одновременно в одной пробирке. ПЦР-РВ позволяет осуществлять количественную оценку содержания ДНК в исследуемом материале. Для постановки этого метода требуется специальный амплификатор со встроенным оптическим блоком, для регистрации флуоресцентного излучения исходящее от образца.

