



АКАДЕМИЯ
ПОСТДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБУ ФНКЦ ФМБА РОССИИ

Кафедра клинической лабораторной диагностики и
патологической анатомии с курсом лабораторной
медицинской микробиологии

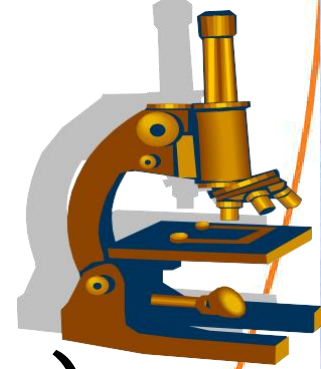
Методы медицинской микробиологии

доктор медицинских наук, профессор Миронов Андрей Юрьевич

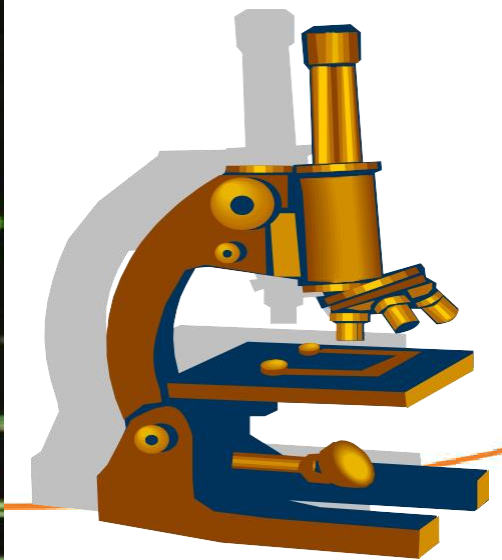
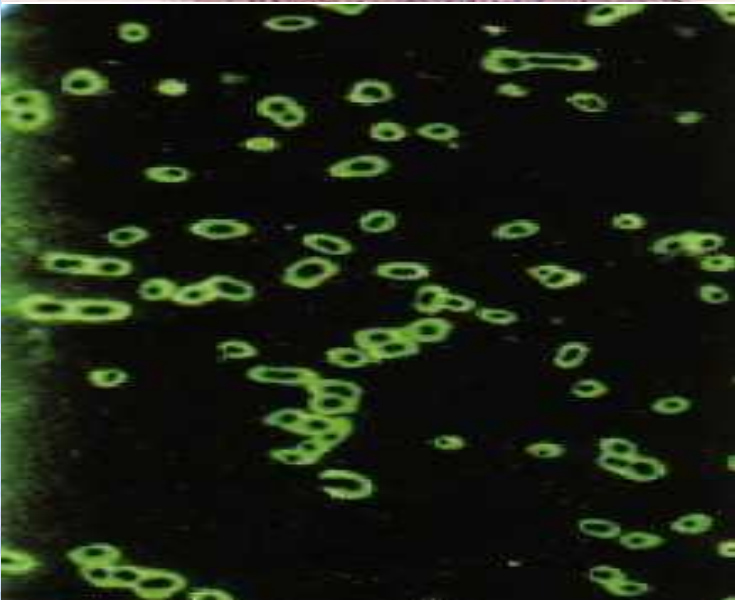
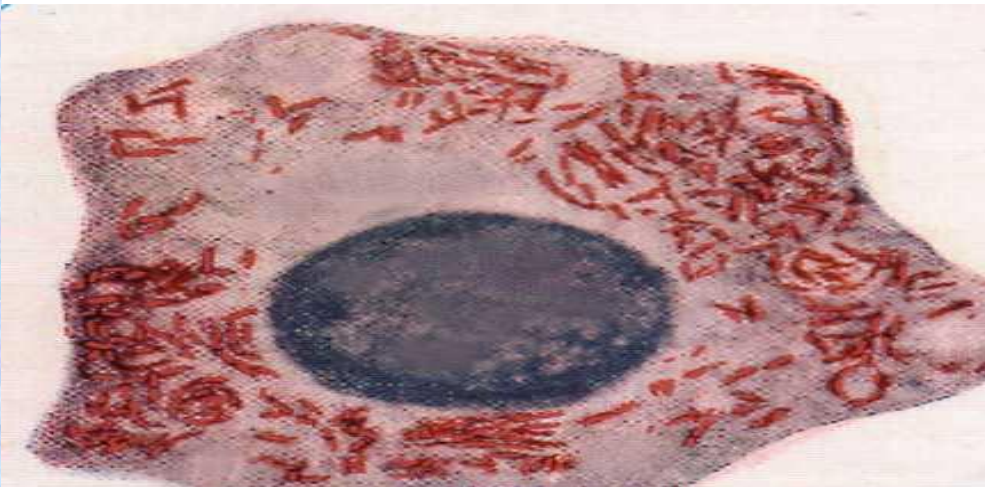
Версия 2023 года

Методы микробиологической диагностики

- микроскопический,
- культуральный,
- биологический,
- серологический,
- аллергический.



Микроскопический метод заключается в
приготовлении препаратов (**нативных или**
окрашенных простыми или сложными методами) из
исследуемого материала и их микроскопии с
применением различных видов микроскопической
техники (**световая, тёмнопольная, фазово-**
контрастная, люминисцентная, электронная и др.). В
бактериологии микроскопический метод получил
название **бактериоскопического**, в вирусологии -
вирусоскопического.



Риккетсии - внутриклеточные альфа-протеобактерии, паразитируют в цитоплазме, некоторые - в ядре эукариотической клетки.

Фазово-контрастная микроскопия внутриклеточных риккетсий

R. typhi – возбудитель эндемического крысиного (блошиного) сыпного тифа, размножается в цитоплазме. Окраска карболовым фуксином и синькой (по П. Ф. Здродовскому)

Препарат риккетсий (РИФ) и электрограмма ультратонкого среза

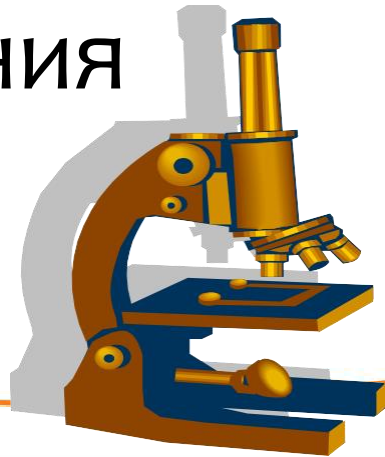


Микроскопический метод

Достоинства:

Недостатки:

- Быстр и прост в выполнении, не требует наличия дорогостоящего оборудования
- Ультрамикроскопические размеры (вирусы, микоплазмы)
- Морфологическое сходство ряда микроорганизмов
- Субъективизм
- Сложность стандартизации и автоматизации



Культуральный метод заключается в посеве исследуемого материала на искусственные питательные среды с целью выделения и идентификации чистой культуры возбудителя или возбудителей. В бактериологии культуральный метод получил название **бактериологического**, в микологии - **микологического**, в протозоологии - **протозоологического**, в вирусологии - **вирусологического**.

Культуральный метод

Достоинства:

1. Возможность изучения целого ряда клинически важных фенотипических свойств микроорганизмов.
2. При условии эффективности выделения – наилучшее соответствие причинной обусловленности ассоциации.

Недостатки:

1. «Некультивируемость» микроорганизма:
 - отсутствие адекватных питательных сред или невозможность подобрать условия культивирования для микроорганизмов определенных видов;
 - неправильный забор клинического материала;
 - несоблюдение условий доставки проб в лабораторию;
 - высев из клинического материала микроорганизма, ингибирующего рост этиологического агента;
 - массивная предшествующая антибиотикотерапия;
2. Длительность анализа
3. Биологическая опасность

Биологический метод



Биологический метод (экспериментальный или **биопроба**) заключается в заражении исследуемым материалом чувствительных лабораторных животных или других биологических объектов (**куриные эмбрионы, культуры клеток**). Его используют для выделения чистой культуры возбудителя, определения типа токсина, определения активности антимикробных химиотерапевтических препаратов и т. д.



Биологический метод

Достоинства:

1. Возможность изучения патогенеза инфекционных заболеваний.
2. Возможность изучения иммунитета инфекционных заболеваний.



Недостатки:

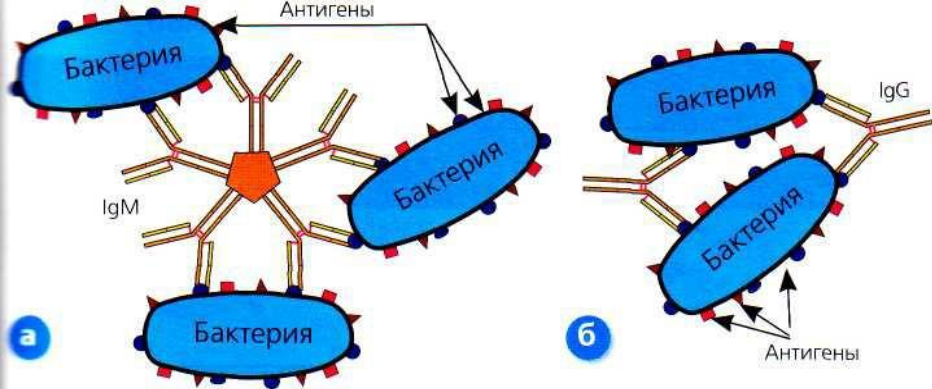
1. Высокая стоимость животных.
2. Этические проблемы.
3. Животные не восприимчивы к возбудителям антропонозных инфекций.



Серологический метод заключается в определении титра специфических антител в сыворотке крови больного или обследуемого, реже в обнаружении микробного антигена в исследуемом материале. С этой целью используются **реакции иммунитета.**

Иммунные реакции

- Реакция агглютинации (РА)
- Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА, РПГА)
- Реакция ко-агглютинации
- Реакция Кумбса
- Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)
- Реакция торможения гемадсорбции (РТГ_{адс})
- Реакция преципитации (РП)
- Реакция нейтрализации (РН)
- Реакция связывания комплемента (РСК)
- Реакция радиального гемолиза
- Реакция иммунного прилипания (РИП)
- Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)
- Иммуноферментный анализ (ИФА)
- Иммунохроматография (ИХ)
- Радиоиммунный анализ (РИА)
- Иммуноблоттинг
- Иммунная электронная микроскопия (ИЭМ)
- Проточная цитометрия



Реакция агглютинации с IgM-антителами (А) и IgG-антителами (Б)



Развернутая реакция агглютинации и на стекле

Реакция агглютинации (от лат. *agglutinatio* - склеивание) - склеивание корпускулярных антигенов (бактерий, эритроцитов, частиц с адсорбированными на них антигенами) антителами в присутствии электролитов (например, изотонического раствора хлорида натрия).

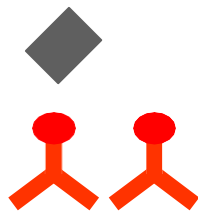
Проявляется в виде хлопьев или осадка, состоящих из корпускул (например, бактерий) «склеенных» антителами.

Реакцию агглютинации используют для:

- определения возбудителя, выделенного от больного;
- определения противомикробных и других антител в сыворотке крови больного

Иммунохроматография

Антитела, адсорбированные на окрашенных частицах



Антивидовые антитела, адсорбированные на хроматографической полоске



Антитела, адсорбированные на хроматографической полоске



Серологический метод

Достоинства:

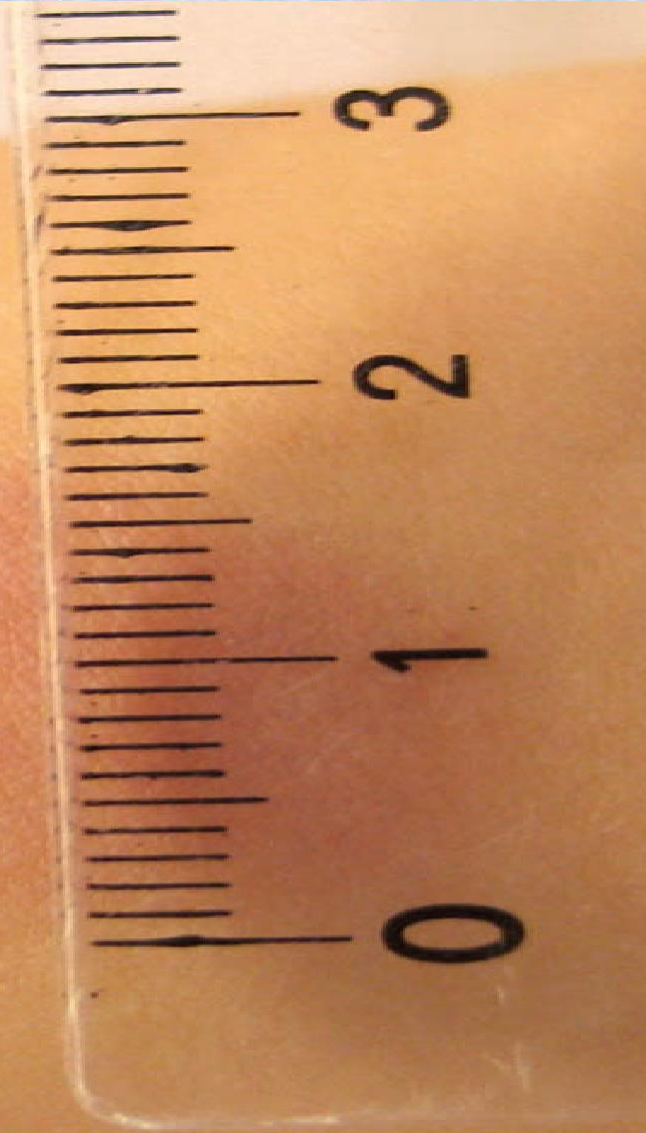
1. Быстрота анализа
2. Низкая стоимость
3. Возможность стандартизации и автоматизации
4. Высокая воспроизводимость результатов анализа
5. Высокая пропускная способность

Недостатки:

1. Непредсказуемая специфичность, необходимость подтверждающих тестов
2. Низкая аналитическая чувствительность, особенно для прямых методов
3. Для косвенных методов характерно несоответствие принципам причинной обусловленности ассоциации (**состояние организма**)

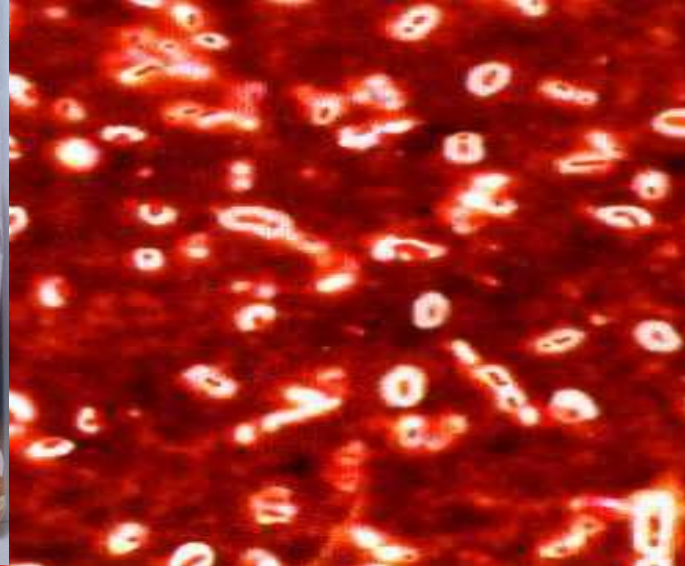
Аллергологический метод заключается в выявлении инфекционной аллергии (**ГЗТ**) на диагностический микробный препарат-аллерген. С этой целью ставят кожные аллергические пробы с соответствующими **аллергенами**

Реакция Манту

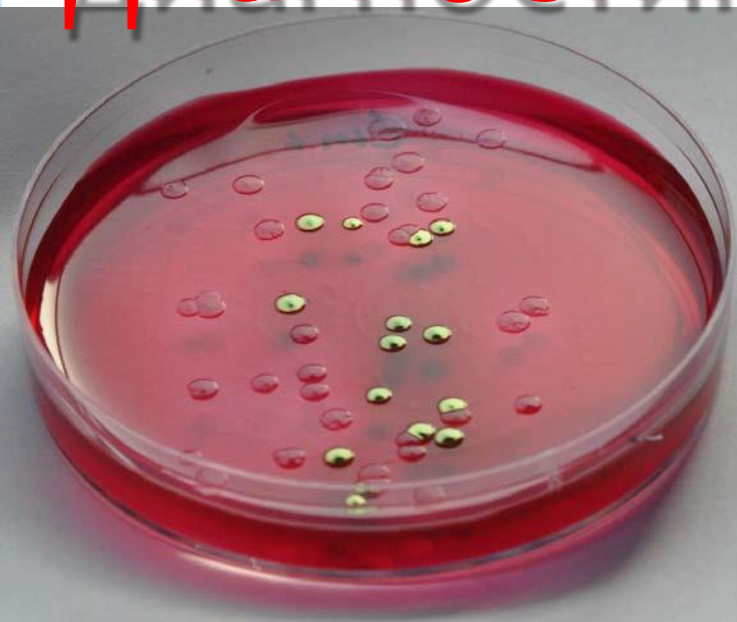


Кожно-аллергические пробы

Болезнь	Аллерген	Аллергическая проба
Туберкулёз	туберкулин	Пирке; Манту
Лепра	лепромин	Мицуды
Чума	пестин	Проба с пестином
Туляремия	тулярин	Проба с тулярином
Бруцеллёз	бруцеллин	Бюрне
Сибирская Язва	антраксин	Проба с антраксином
Лихорадка Ку	Риккетсии Бернета	Проба с риккетсиями Бернета
Токсоплазмоз	токсоплазмин	Проба с токсоплазмином
Лейшманиоз	лейшманиин	Проба с лейшманиином
Гистоплазмоз	гистоплазмин	Проба с гистоплазмином
Бластомикоз	бластомицин	Проба с бластомицином

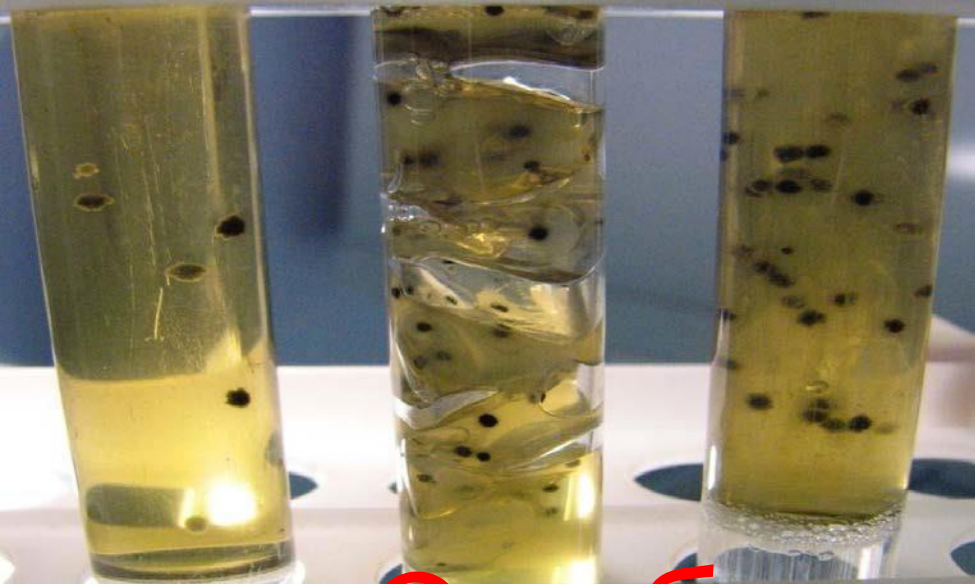


Методы микробиологической диагностики бактериальных инфекций

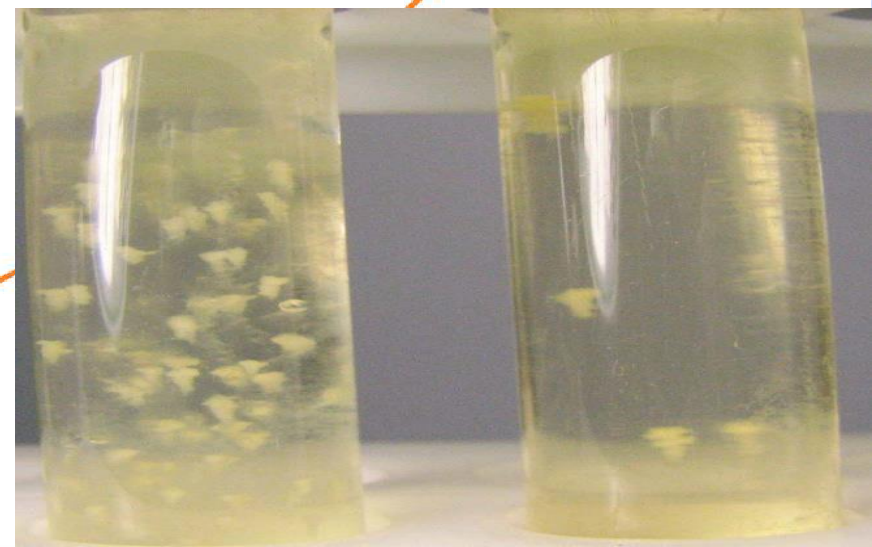
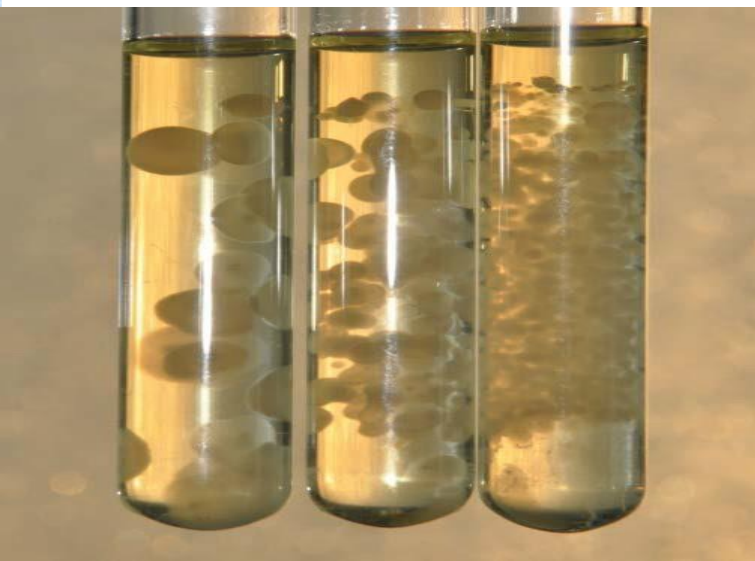


Методы диагностики бактериальных инфекций

- бактериоскопический,
- бактериологический,
- биологический,
- серологический,
- аллергологический.



Особенности диагностики анаэробных инфекций





Газовый хроматограф

Экспресс-диагностика АНИ

основана на индикации в анализе (гно́й, ликвор, кровь и т. д.) летучих жирных кислот (ЛЖК), являющихся молекулярными маркёрами облигатных анаэробных бактерий.

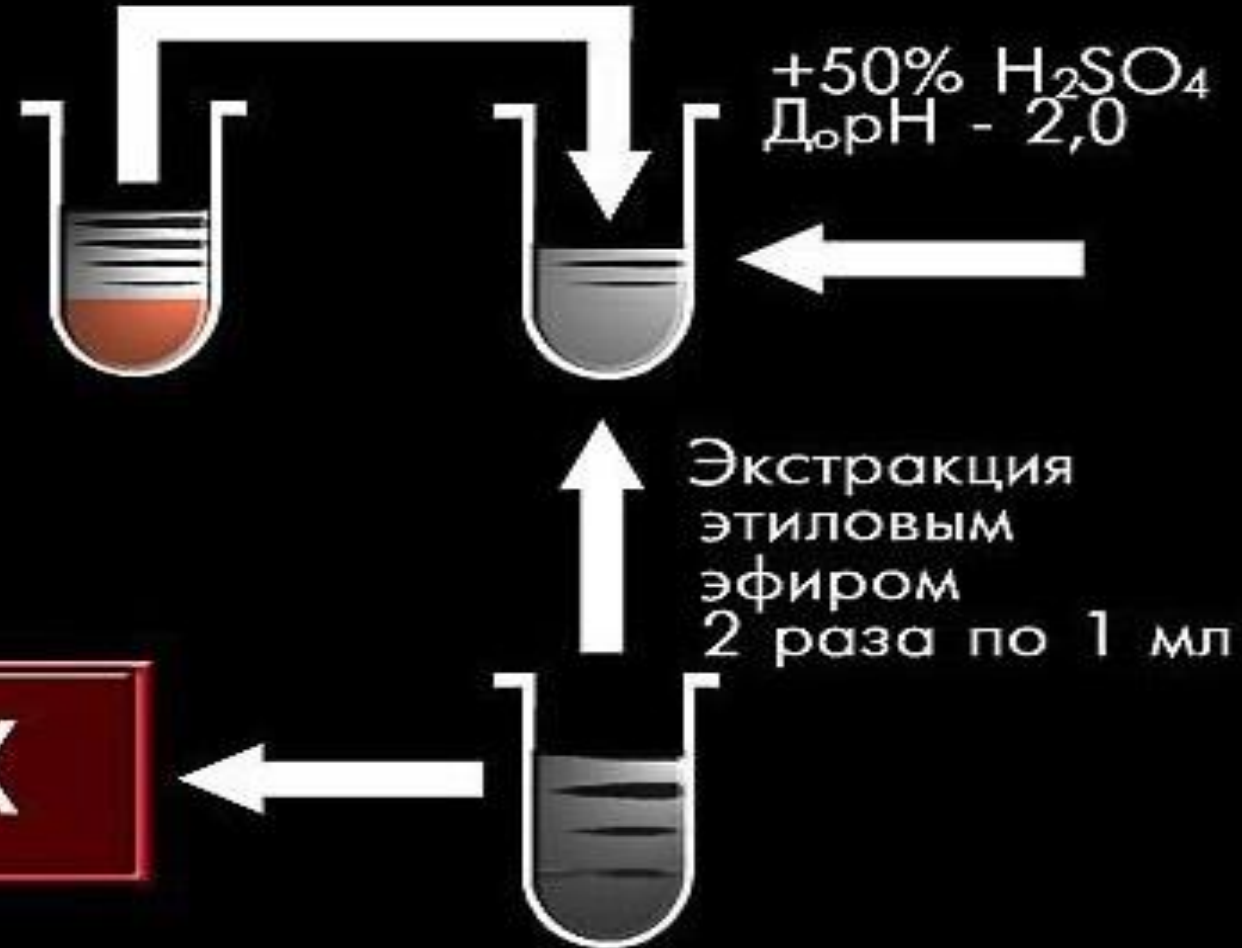
Индикация анаэробов методом газовой хроматографии

Пунктаты флегмон
абсцессов

1 мл

Центрифуги-
рование
3000 об/мин
15 мин

Биоптаты
ран



Молекулярные маркёры анаэробов

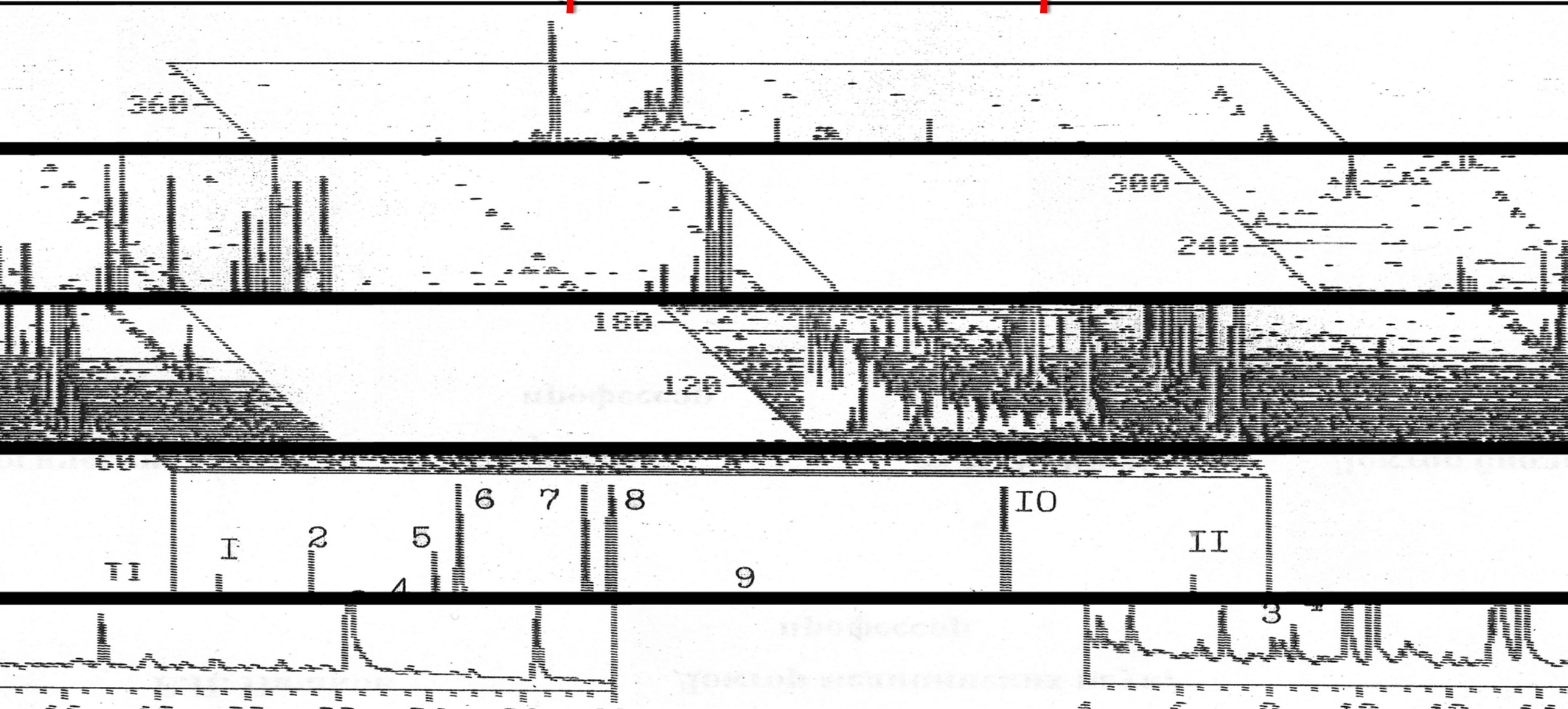
ЛЖК (C₂-C₇):

- Пропионовая,
- Масляная,
- Изомасляная,
- Валериановая,
- Изовалериановая,
- Капроновая,
- Изокапроновая,
- Гексановая,
- Каприловая.

Длинноцепочечные кислоты:

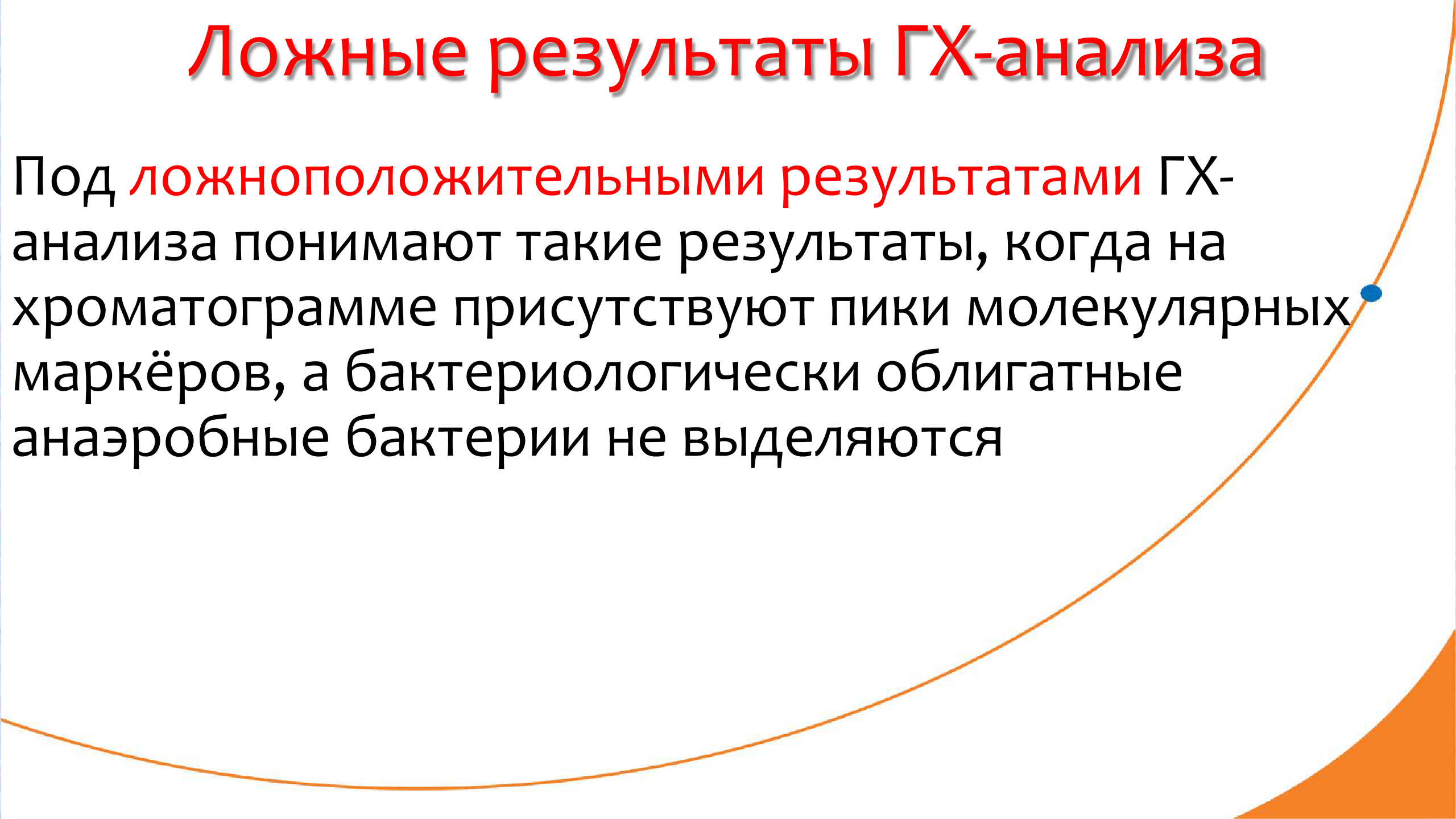
- Молочная,
- Янтарная,
- Фумаровая,
- Яблочная,
- Янтарная и др.

Хроматограмма молекулярных маркёров анаэробных бактерий



Ложные результаты ГХ-анализа

Под **ложноположительными результатами** ГХ-анализа понимают такие результаты, когда на хроматограмме присутствуют пики молекулярных маркёров, а бактериологически облигатные анаэробные бактерии не выделяются

A decorative orange curved line starts from the bottom left, curves upwards and to the right, ending near the top right corner. A small blue dot is located on this line, positioned to the right of the main text block.

Ложные результаты ГХ-анализа

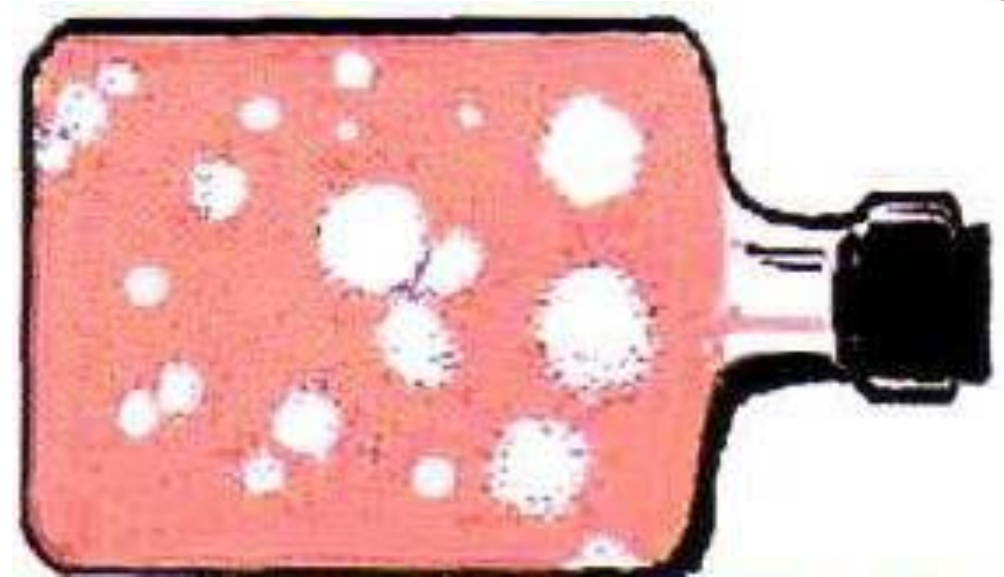
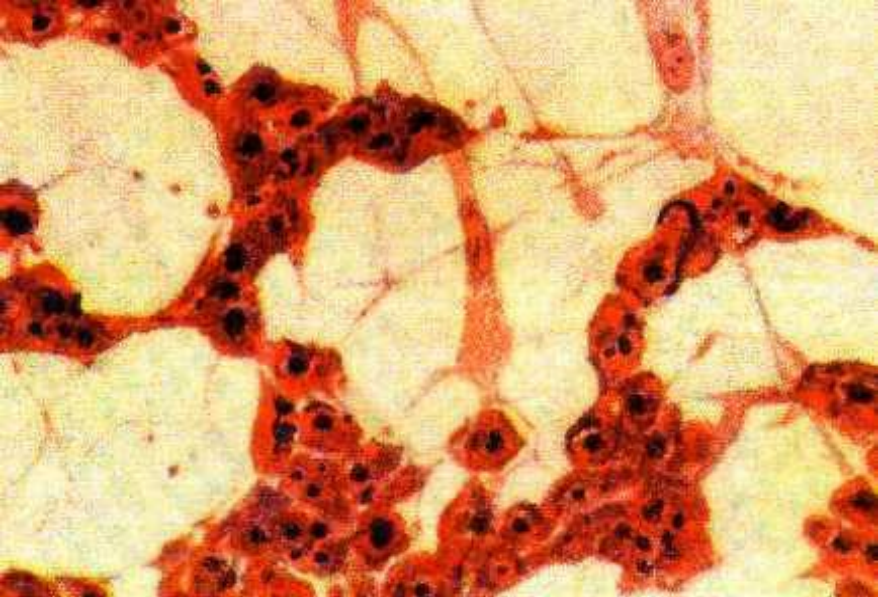
Под **ложноотрицательными результатами** ГХ-анализа понимают такие результаты, когда на хроматограмме отсутствуют пики молекулярных маркёров, хотя облигатные анаэробы присутствуют в материале и могут быть изолированы

Причины ложных результатов ГХ-анализа

Ложноположительные	Ложноотрицательные
Несовершенство бактериологических методик (забора, транспортировки, культивирования и т. д.)	Низкая чувствительность детектора (при работе на хроматографе, оснащённом катарометром)
Массивная предшествующая антибиотикотерапия	Наличие в анализе анаэробов не продуцирующих ЛЖК
Высокая обсеменённость стафилококками анализа при инфекции, вызванной монокультурой <i>Staphylococcus aureus</i>	Запредельное разведение анализа (перитонеальный диализат, промывные воды и т. п.)
Проявление «памяти» хроматографических колонок, пневматического дозатора при проведении массовых анализов	Очень низкий уровень продукции ЛЖК при моноинфекции, вызванной <i>Bacteroides fragilis</i> и некоторыми другими видами анаэробов
Некоторые глистные инвазии	Наличие в анализе аэробно-анаэробных полимикробных ассоциаций, включающих аэробные виды, способные метаболизировать ЛЖК, продуцируемые анаэробами (например, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)



Информативность газо-хроматографической индикации
молекулярных маркёров анаэробов по сравнению с
традиционными клинико-лабораторными показателями



Методы микробиологической диагностики вирусных инфекций



Методы диагностики вирусных инфекций

- вирусоскопический,
- вирусологический,
- серологический.

Вирусоскопический метод заключается в обнаружении вируса в исследуемом материале под микроскопом. Чаще всего используют электронный микроскоп, реже люминисцентный. Световая микроскопия из-за ничтожно малых размеров вирусов практически не применяется. Лишь для обнаружения крупных вирусов, используя методы «сверхокраски», можно применить световой микроскоп. С помощью светового микроскопа можно выявить внутриклеточные включения, которые образуются в поражённых клетках при некоторых инфекциях.

Вирусологический метод заключается в заражении исследуемым материалом чувствительной биологической модели (**лабораторные животные, куриные эмбрионы или культуры клеток**), индикации вируса и его последующей идентификации.

Техника заражения куриных эмбрионов для выделения вирусов



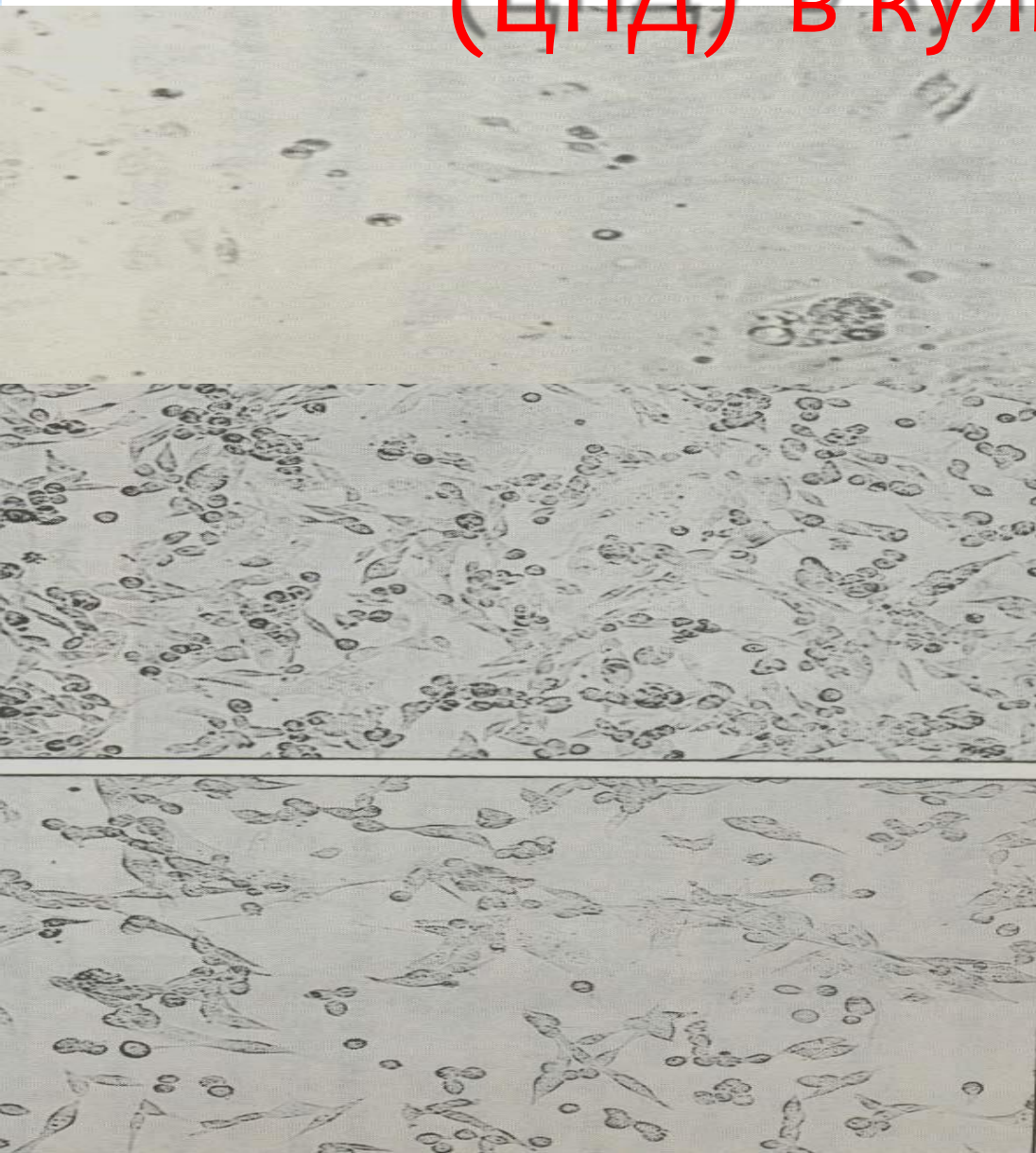
в амнион



в аллантоисную
полость

При заражении лабораторных животных индикация вирусов производится, как правило, по клинической картине болезни, патологоанатомическим изменениям ориентировочно и окончательно, например, с помощью РГА. РГА позволяет выявить вирусы в курином эмбрионе, видимых изменений при вскрытии которого, как правило, не наблюдается. В культуре клеток наличие вируса определяют по ЦПД (в том числе образованию внутриклеточных включений), гемадсорбции, феномену бляшкообразования, РГА, отсутствию изменения окраски индикатора. Идентификация вируса осуществляется с помощью серологических реакций (РПГА, РТГА, РН, РСК, ИФА и др.).

Развитие цитопатического действия (ЦПД) в культуре клеток MDCK



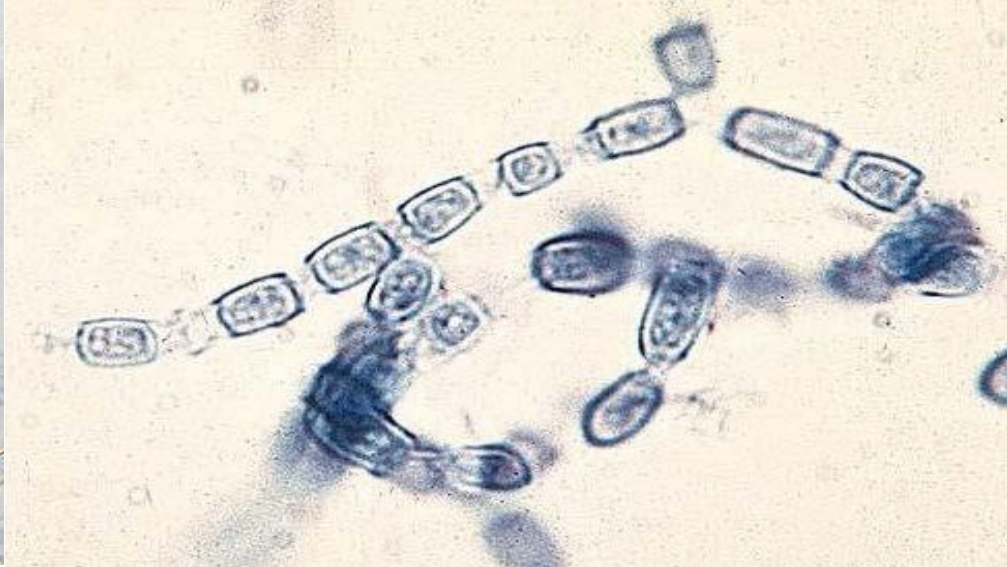
перед заражением

24-48 часов после заражения

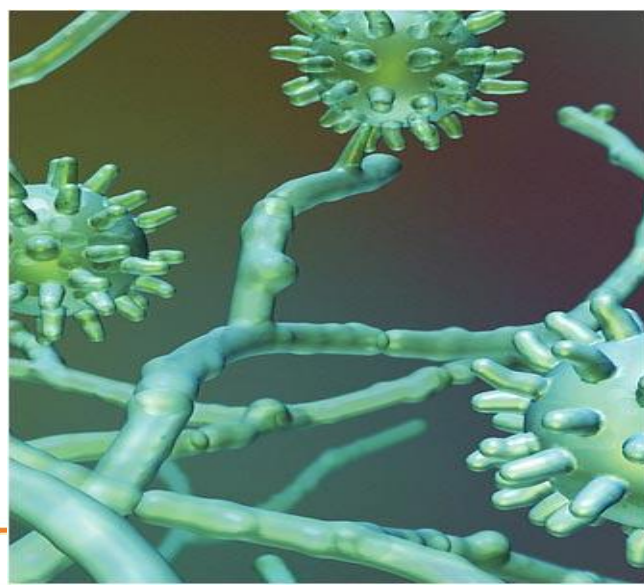
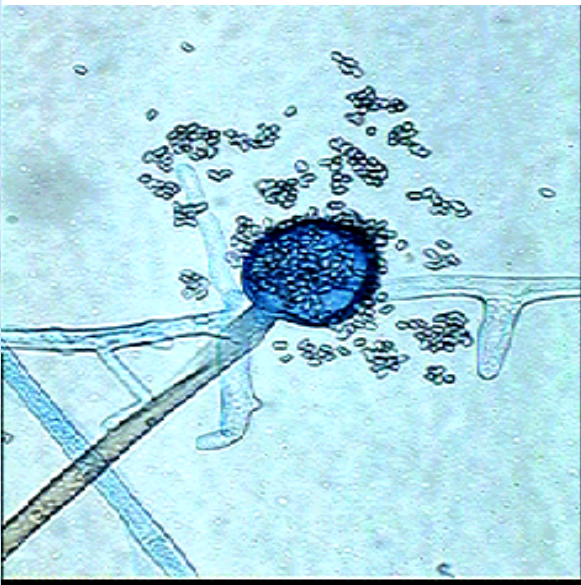
48-72 часов после заражения

Особенностью **серологического метода** в вирусологии является исследование парных сывороток. Первую сыворотку берут у больного в острый период в начале болезни, хранят при температуре $+4^{\circ}$ - $+8^{\circ}$ C, вторую сыворотку берут через 10-14 дней. Сыворотки исследуют одновременно. О болезни свидетельствует сероконверсия, то есть нарастание титра антител во второй сыворотке по отношению к первой.

Диагностической является **сероконверсия в 4 раза и выше**. Так как многие вирусные болезни протекают остро, этот вариант серологического метода обычно применяют для ретроспективной диагностики.



Особенности микробиологической диагностики микозов



Методы диагностики микозов

- микроскопический,
- микологический (культуральный);
- серологический;
- биологический (экспериментальный);
- аллергологический;
- гистологический

Диагностика микозов

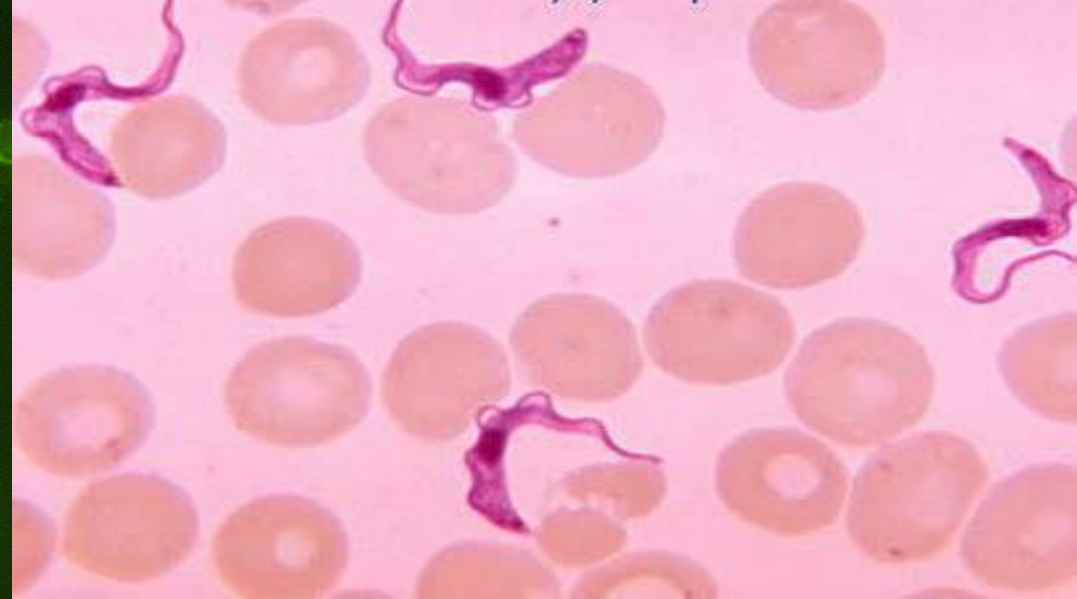
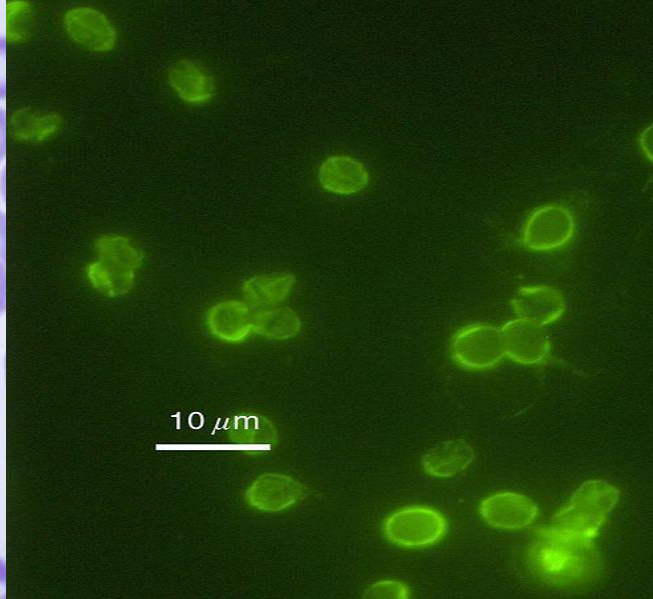
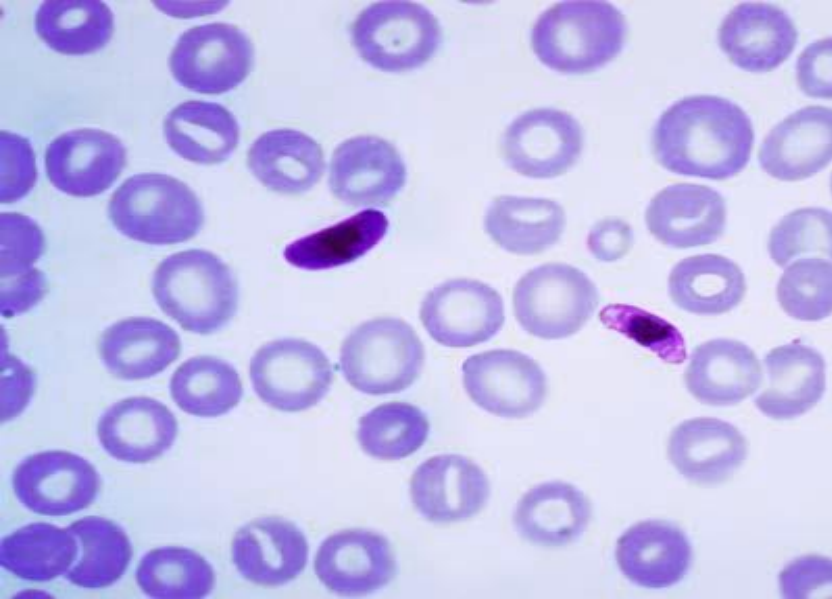
- Основной метод - микроскопический.
- Большая продолжительность микологического метода (**несколько недель**) из-за медленного роста грибов.
- Обнаружение антител при серологическом исследовании возможно со 2-4-ой недели болезни. При некоторых заболеваниях выявляют специфические антигены в исследуемом материале.
- Нередко при микозах используют гистологический метод, заключающийся в обнаружении элементов гриба (**споры, конидиальные головки и т. п.**) в поражённых органах и тканях. С этой целью готовят гистологические тонкие или ультратонкие срезы тканей, окрашивают их специальными гистологическими и гистохимическими методами, исследуют с применением световой, а при необходимости и электронной микроскопии.

Методы окраски грибов

- по Граму-Вельшу
- по Берку
- по Бессоне
- по МакМанусу
- по Сабуро
- лактофенолом
- Лактофуксином
- по Граму
- по Цилю-Нельсону,
- по Райту
- по Романовскому-Гимзе
- по Лейшману
- по Аравийскому
- по Адамсону,
- по Хаммершмидту

Алергологический метод

- проба с гистоплпзмином (гистоплазмоз)
- проба с бластомицином (бластомикоз)



Особенности микробиологической диагностики протозойных инвазий



Методы диагностики протозоозов

- микроскопический
- протозоологический (культуральный)
- серологический
- биологический (экспериментальный)
- аллергический
- гистологический

A close-up photograph of a hand wearing a black nitrile glove, holding a glass slide. On the slide, there is a red, circular smear, likely a blood smear. The background is blurred, showing a crowd of people outdoors.

Микроскопическое исследование патологического материала заключается в приготовлении как нативных препаратов («толстая капля»), так и мазков, окрашенных по методу Романовского-Гимза и является основным методом диагностики заболеваний, вызванных простейшими. В некоторых случаях применяют серологический и аллергический методы диагностики.

Микроскопический метод

Направлен на выявление паразитов в нативных и окрашенных препаратах.

Материал для исследования:

- кровь – мазок и толстая капля (малярия, трипаносомоз, лейшманиоз);
- пунктат грудины и лимфоузлов (трипаносомоз, лейшманиоз);
- соскобы кожи (лейшманиоз);
- фекалии (амёбиаз, балантидиоз, лямблиоз, трихомоноз);
- отделяемое уретры и слизистой оболочки наружных половых органов (трихомоноз).

Trichomonas vaginalis



Методы окраски простейших

- по Романовскому-Гимзе
- по Романовскому-Гимзе в модификации Филипсона
- по Лейшману
- по Гейденгайну
- метиленовым синим
- раствором Люголя
- консервантом Барроу
- консервантом Сафарлиева

Методы обогащения (**флотация или седиментация**) цист применяются при скудном содержании их в исследуемом материале.

Протозоологический метод

Направлен на выделение чистой культуры простейших и её идентификацию.

Материал для исследования:

- кровь (трипаносомоз, лейшманиоз);
- пунктат грудины, лимфоузлов, селезёнки (трипаносомоз, лейшманиоз);
- ликвор (трипаносомоз, лейшманиоз);
- соскобы язв кожи (трипаносомоз, лейшманиоз);
- фекалии (амёбиаз, балантидиоз, лямблиоз, трихомоноз).

Простейших паразитирующих в ЖКТ
(дизентерийные амёбы, балантидии, кишечные
трихомонаты, хиломастиксы), легче выявить
микроскопически, чем при культивировании

Серологический метод

- РА (американский трипаносомоз);
- РП (американский трипаносомоз, амёбиаз);
- РНГА (токсоплазмоз);
- РСК (американский трипаносомоз, токсоплазмоз, висцеральный лейшманиоз, амёбиаз);
- РИФ (американский трипаносомоз, малярия, токсоплазмоз, висцеральный лейшманиоз, амёбиаз);
- ИФА (американский трипаносомоз, токсоплазмоз, тропическая малярия, амёбиаз, кожный и висцеральный лейшманиоз)

Биологический метод

Применяется для подтверждения диагноза протозоозов, изучения факторов патогенности, патогенеза, патологической анатомии протозоозов, эффективности лекарственных средств и др.

- крысы 2-3 нед. (амёбиаз, балантидиоз);
- морские свинки (амёбиаз, балантидиоз, американский трипаносомоз);
- котята (амёбиаз, балантидиоз);
- щенки (амёбиаз, балантидиоз);
- хомяки (амёбиаз, балантидиоз, лейшманиоз);
- мыши (лямблиоз, лейшманиоз, токсоплазмоз);
- мартышки (африканский трипаносомоз)

Алергологический метод

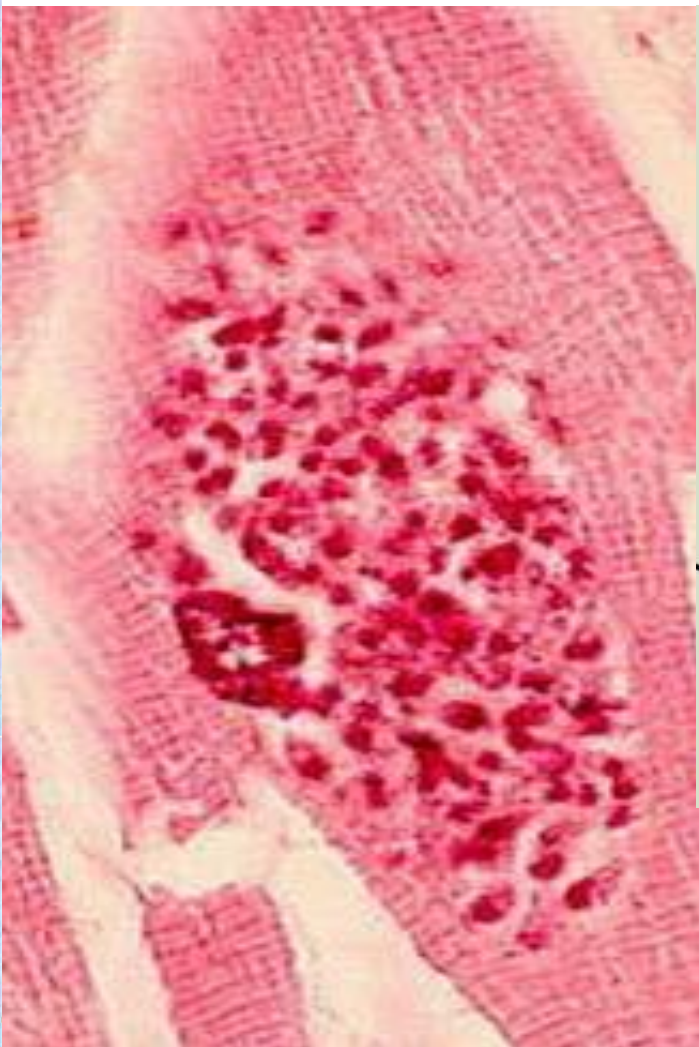
- проба с лейшманином (кожный лейшманиоз)
- проба с токсоплазмином (токсоплазмоз)

Гистологический метод

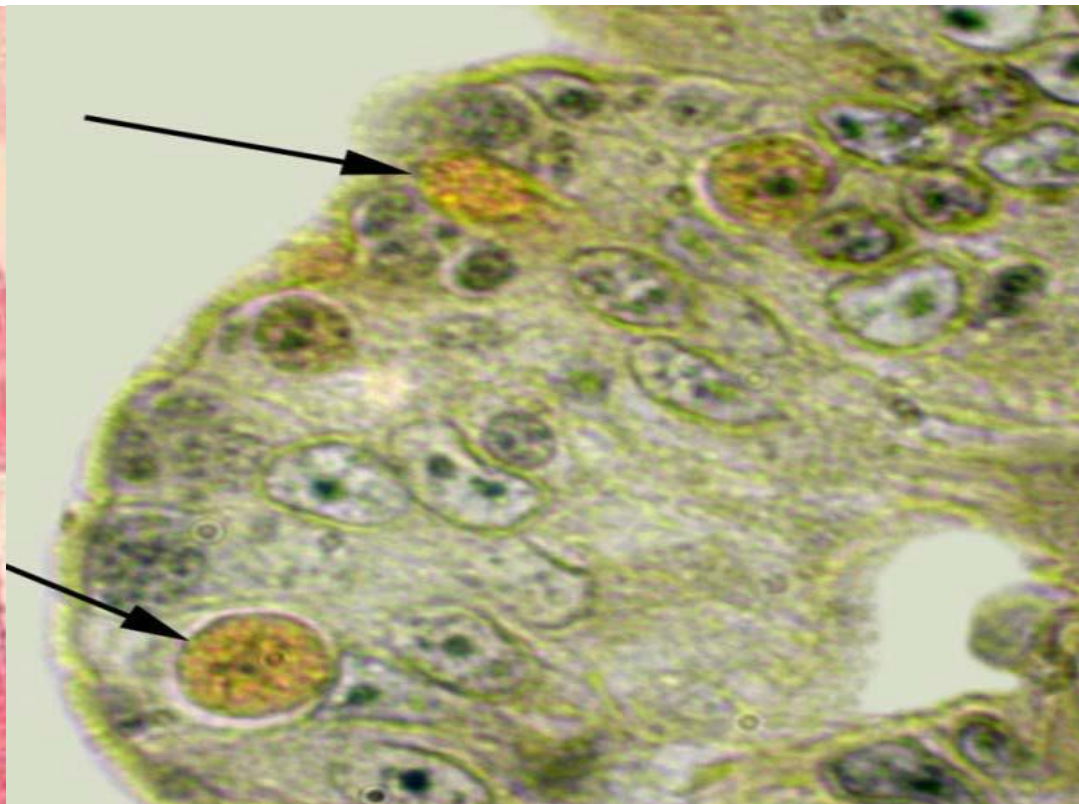
Простейшие можно обнаружить в гистологических препаратах, приготовленных из поражённых тканей:

- висцеральный лейшманиоз;
- трипаносомоз;
- токсоплазмоз;
- злокачественная форма малярии.

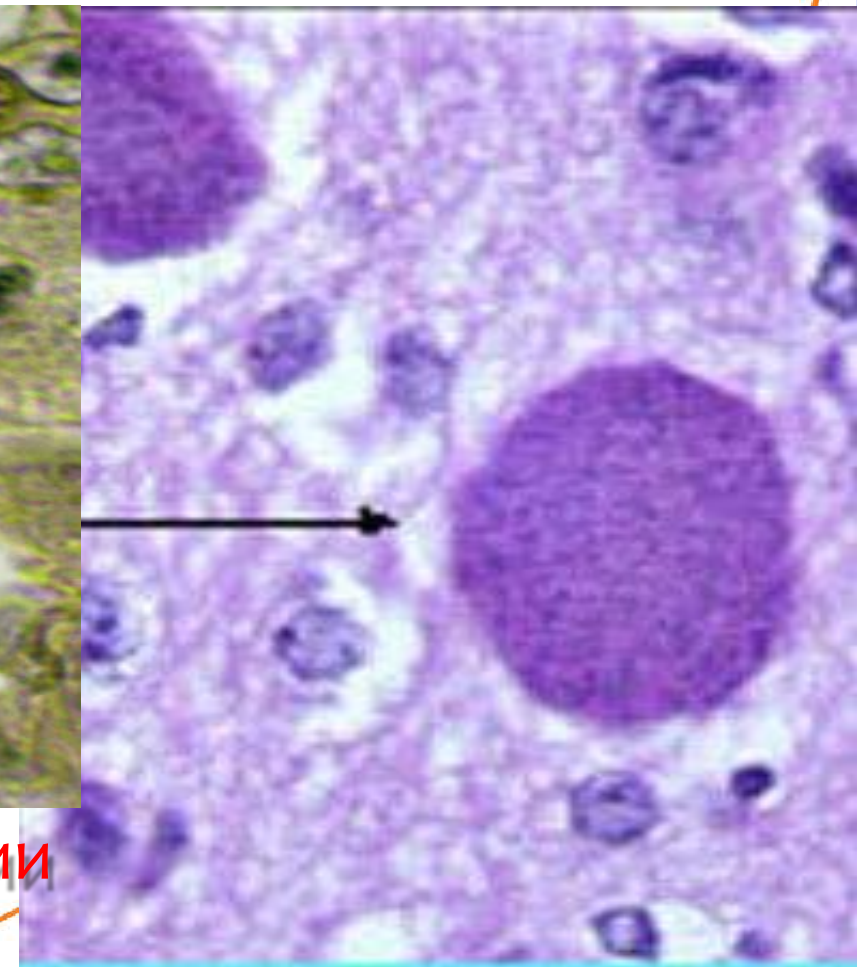
Гистологический метод



Циста в миокарде

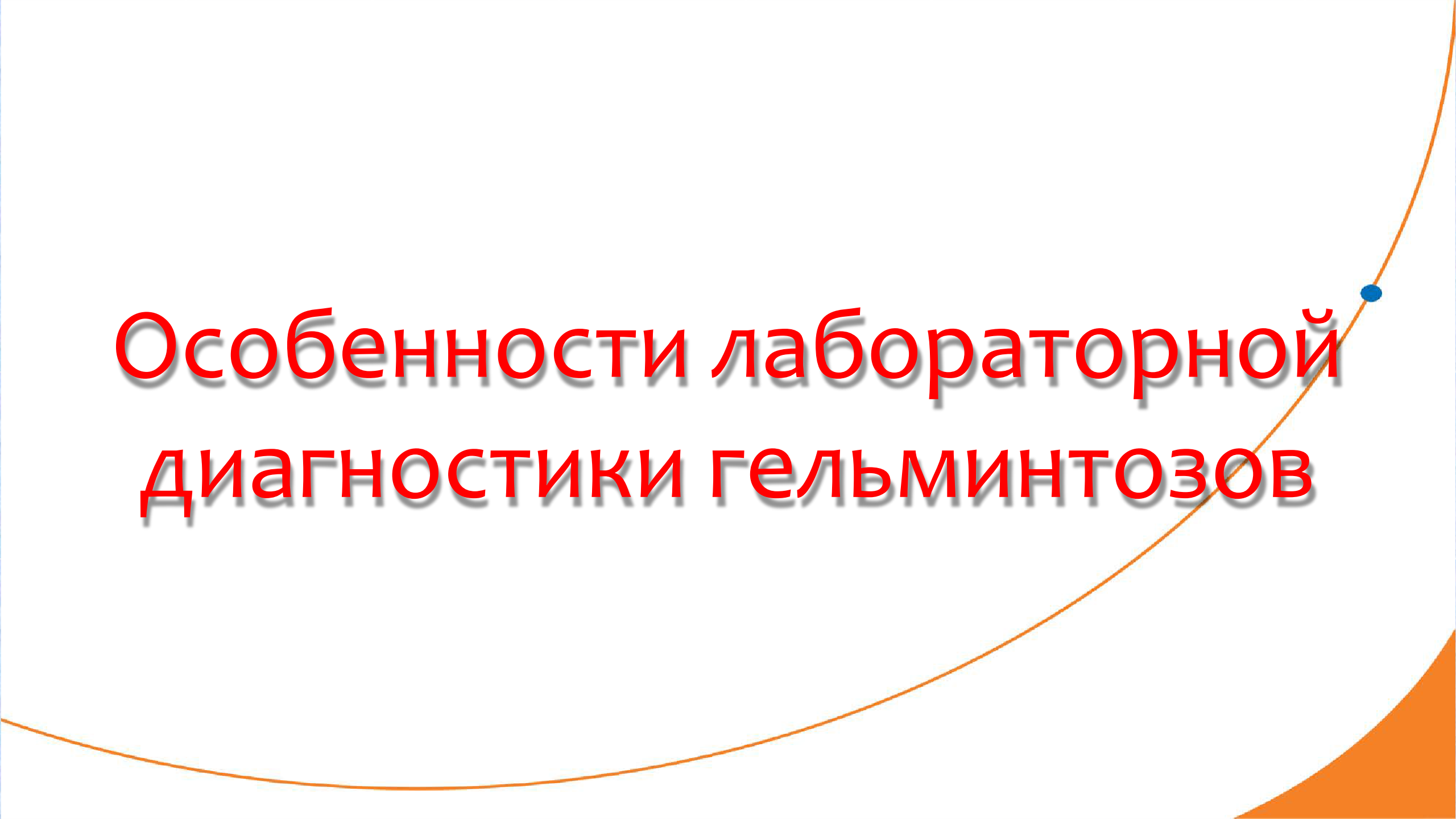


Незрелые ооциты в эпителии
кишечника



Циста в мозге

Особенности лабораторной диагностики гельминтозов

A decorative orange curve starts from the bottom left, arcs upwards and to the right, ending near the top right corner. A small blue dot is positioned on this curve, just above the end of the main title text.

Методы диагностики гельминтозов

- микроскопический
- серологический
- аллергический
- гистологический

Серологический метод

- РА (эхинококкоз);
- РП (трихинеллёз, аскаридоз, шистосомоз Мансона);
- РНГА (трихинеллёз, эхинококкоз);
- РСК (трихинеллёз, шистосомоз, филяриатоз);
- РИФ (шистосомоз, трихинеллёз, филяриатоз);
- ИФА (эхинококкоз, альвеококкоз, трихинеллёз, токсокароз, опистархоз, фасциозёз, шистосомоз Мансона, филяриатоз)

Ограниченность использования серологического метода для диагностики гельминтозов обусловлена сложностью получения очищенных антигенных препаратов из многих гельминтов. В большинстве случаев антигены, применяемые для серодиагностики, представляют собой неочищенные и неохарактеризованные препараты (дезинтегрированные гельминты или их экстракты). Этим обусловлены многочисленные перекрёстные реакции. Эффективность серологической диагностики гельминтозов будет возрастать по мере выделения и очистки соответствующих антигенов и создания на их основе коммерческих диагностикумов.

Алергологический метод

- проба с эхинококковым аллергеном (эхинококкоз);
- проба с трихинеллёзным аллергеном (трихинеллёз);
- проба с шистосомным аллергеном (шистосомоз);
- проба с опистархозным аллергеном (опистархоз);
- проба с аскаридозным аллергеном (аскаридоз).

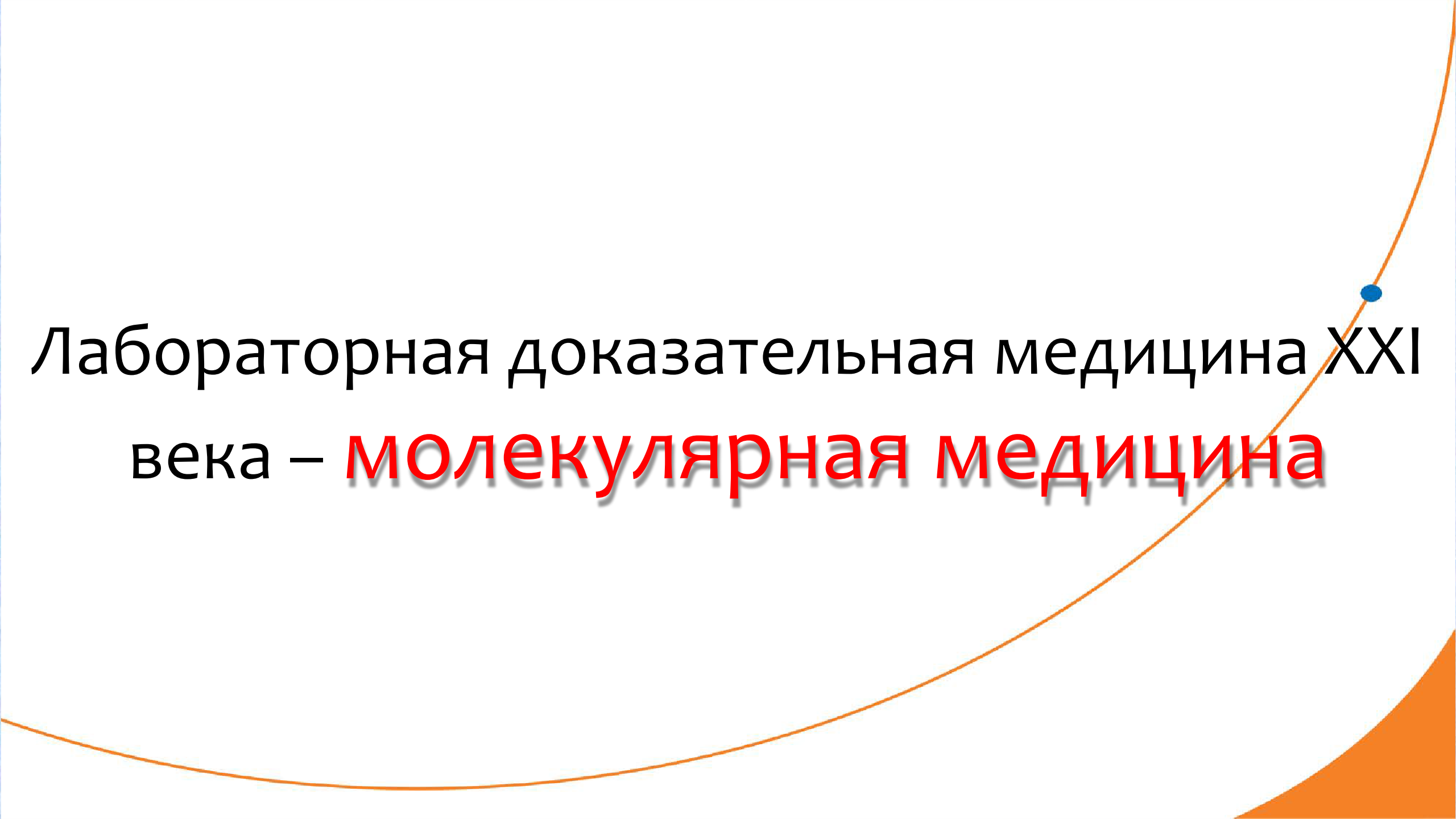
Внутрикожные аллергические пробы имеют относительную диагностическую ценность из-за частого развития неспецифических реакций

Гистологический метод

Гельминты можно обнаружить в гистологических препаратах, приготовленных из поражённых органов и тканей:

- биоптаты или скарификатах кожи (микрофилярии, иногда личинки шистосом и гельминтов, вызывающих линейный дерматит);
- биоптаты мышечной и соединительной ткани (личинки трихинелл и цестод, цистицерки, яйца шистосом, эхинококки и др.);
- биоптаты слизистой оболочки толстой кишки и мочевого пузыря (шистосомы);
- пунктаты кисты, абсцесса (эхинококк, альвеококк, спарганум, цистицерк, дирофилярии, аскариды, токсокара, парагонимус и др., их фрагменты, личинки, яйца)

Методы молекулярной диагностики

A decorative orange curve starts from the bottom left, arcs upwards and to the right, and ends at the top right. A small blue dot is located on this curve, positioned above the word "медицина" in the text.

Лабораторная доказательная медицина XXI
века – **молекулярная медицина**

Основной постулат молекулярной медицины:

Для каждой болезни каждого патологического проявления организма имеется **молекулярная мишень**, которую можно использовать как для диагностики заболевания, так и для лекарственного воздействия

Молекулярная диагностика

Использование современных технологических и инструментальных разработок существенно расширяет возможности молекулярной диагностики. Все патогены могут быть диагностированы методами молекулярной биологии, причём более точно и в более короткие сроки, чем это можно сделать с помощью классических микробиологических методов.

Молекулярная диагностика

(син. молекулярно-биологическая диагностика)

раздел диагностики *in vitro*, включающий все специфические методы, направленные на анализ нерегулярных биополимеров – ДНК, РНК, белков

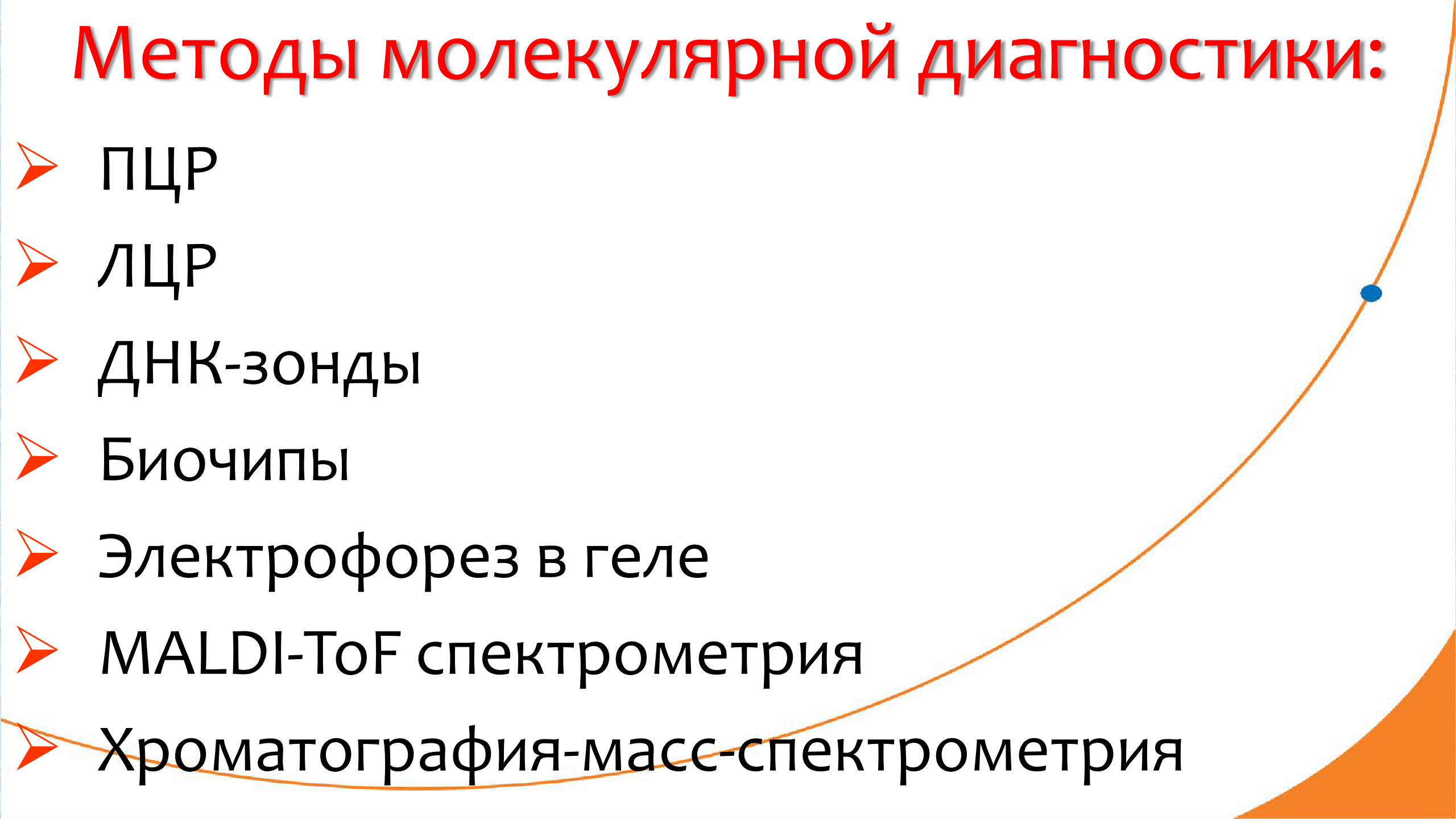
Разделы молекулярной диагностики

Молекулярно-генетический
анализ ДНК и РНК
генотипический подход

Протеомный анализ (белки)



Методы молекулярной диагностики:

- ПЦР
 - ЛЦР
 - ДНК-зонды
 - Биочипы
 - Электрофорез в геле
 - MALDI-ToF спектрометрия
 - Хроматография-масс-спектрометрия
- 
- A decorative orange curve starts from the bottom left, goes up and to the right, and then curves down towards the bottom right. A small blue dot is located on the upper part of the curve, near the top right corner of the slide.

Применение **методов молекулярной диагностики** в клинической микробиологии оправдано в тех случаях, когда классические микробиологические методы оказываются несостоятельны или занимают слишком много времени

Молекулярная диагностика

Одна из современных тенденций молекулярной диагностики - разработка и внедрение системы «point-of-care - POC» (диагностика «у постели больного») и сети соответствующих лабораторий. Преимущества применения диагностических тестов «point-of-care» заключаются в быстроте и простоте их постановки, доступности, низкой стоимости, отсутствии необходимости использования сложного оборудования, что позволяет максимально приблизить проведение тестирования к объекту исследования, и ускорить получение результата.

Молекулярная диагностика

Одним из направлений современной лабораторной медицины является мультиплексная диагностика, которая предполагает одновременное определение множества различных аналитов в одном образце. При разработке систем для комплексного выявления маркёров инфекционных заболеваний перспективным подходом представляется использование технологии микрочипов (биочипов) и ПЦР-РВ.

Генотипический подход к идентификации микроорганизмов

Достоинства:

Недостатки:

- Соответствует принципам причинной обусловленности ассоциации
 - Возможность получения результатов независимо от «культивируемости» микроорганизмов
 - Математически возможная чувствительность
 - Высокая информативность и точность генетических маркёров
 - Возможность стандартизации и автоматизации
 - Возможность проведения строгих количественных измерений
 - Низкая стоимость анализа
- Сложная связь важных в клинике фенотипических признаков и генотипических маркёров
 - Неэффективность подхода при выявлении микроорганизмов, для которых характерно их отсутствие (исчезающе низкое содержание) в биологических жидкостях



Полимеразная цепная реакция

Репликация ДНК в клетке – прообраз полимеразной цепной реакции

- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - молекулярно-биологическая реакция, направленная на синтез большого количества копий специфического фрагмента ДНК *in vitro*.
- ПЦР представляет собой многократное увеличение числа копий (**амплификация**) специфического участка ДНК катализируемое ферментом ДНК-полимеразой.



Изобретение ПЦР

- Принцип ПЦР сформулировал Гобинд Корана в 1971 г.
- В 1983 г. **Кэри Мюллису** удалось провести ПЦР
- В 1993 г. за изобретение ПЦР Кэри Мюллису вручена Нобелевская премия по химии

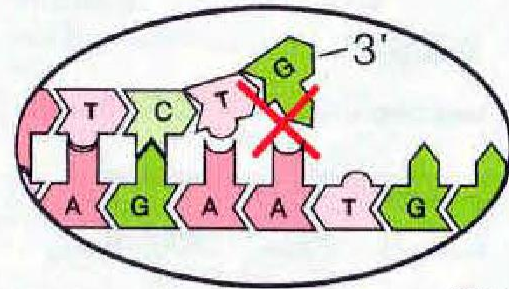
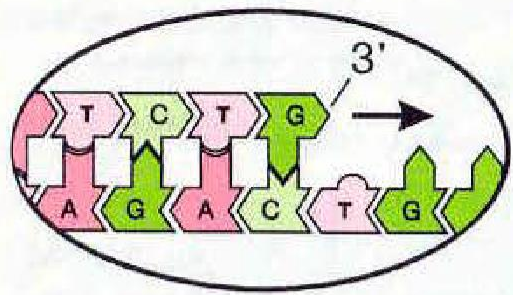
Стадии репликации ДНК:

1. Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК);
2. Образование коротких двухцепочечных участков ДНК (затравок, необходимых для инициации синтеза ДНК);
3. Синтез новой цепи ДНК (комплементарное достраивание обеих нитей)

ПЦР диагностика инфекционных заболеваний

Данный процесс используется для получения копий коротких участков ДНК, специфичных для конкретных микроорганизмов, т. е. осуществляется целенаправленный поиск специфических участков, что и является целью молекулярно-генетической диагностики инфекционных заболеваний.

Специфичность ПЦР



Мисматч

Отсутствие специфических
(комплементарных) участков

Отсутствие ДНК

Амплификация

Отсутствие
амплификации

Специфический
продукт



ПЦР диагностика инфекционных заболеваний

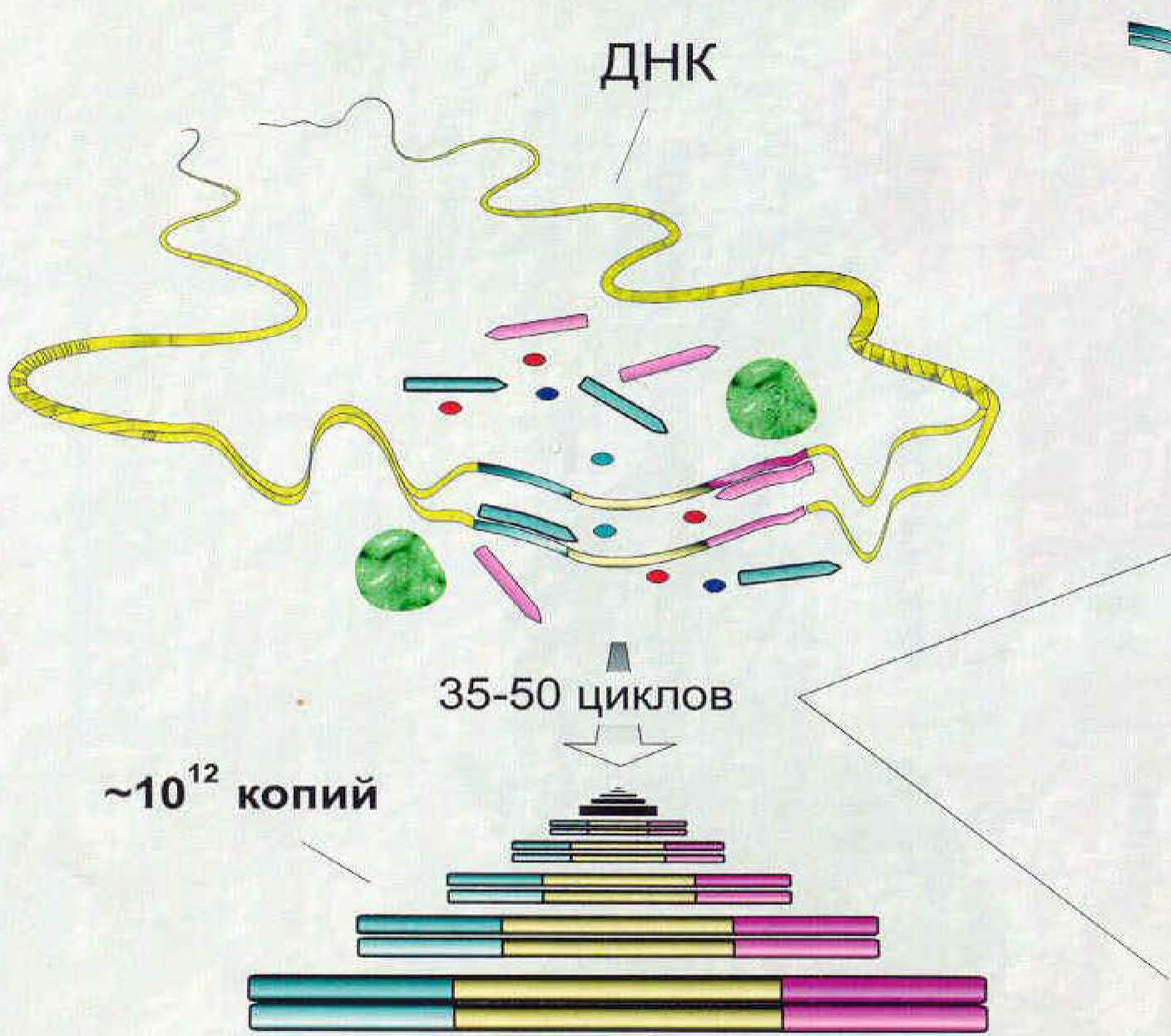
Открытие термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы) из термофильных бактерий *Thermis aquaticus*, оптимум работы которой находится в области 70-72°C, позволило сделать процесс репликации ДНК циклическим и использовать его для работы *in vitro*.

ПЦР диагностика инфекционных заболеваний

При многократном повторении циклов синтеза происходит экспоненциальное увеличение числа копий специфического фрагмента ДНК, что позволяет из небольшого количества анализируемого материала, который может содержать единичные клетки микроорганизмов получить достаточное количество ДНК копий для идентификации их методом электрофореза.

ПЦР диагностика инфекционных заболеваний

Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют две олигонуклеотидные затравки (**20 нуклеотидных пар**), называемые праймерами. •
Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы так, что достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними.

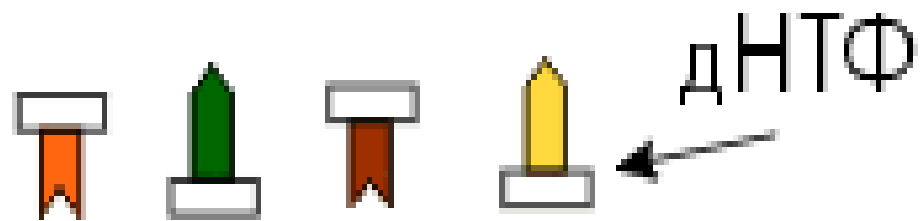


Принцип полимеразной цепной реакции

Компоненты ПЦР

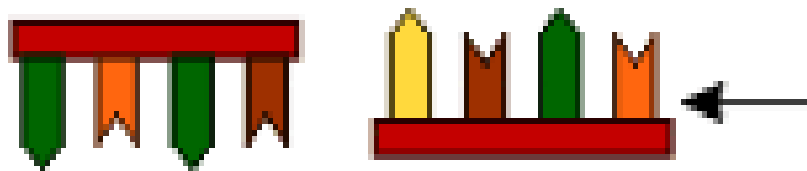
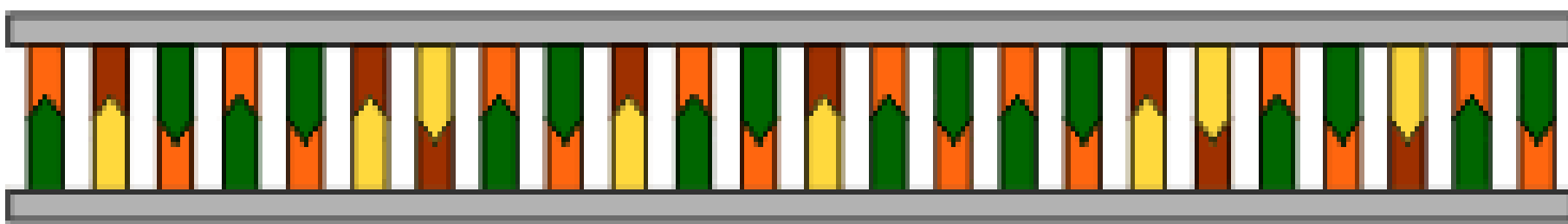
- **Праймеры** (синтетические олигонуклеотиды 20-30 нуклеотидных пар, комплементарные последовательностям ДНК на границах определяемого специфического фрагмента). Выбор специфического фрагмента и подбор праймеров играет важнейшую роль в специфичности проведения амплификации, что сказывается на качестве проведения анализа.
- **Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ)** (смесь четырёх дНТФ, являющихся материалом для синтеза новых комплементарных цепей ДНК).
- **Фермент Taq-полимераза** (термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путём последовательного присоединения нуклеотидных оснований к растущей цепи синтезируемой ДНК).
- **Буферный раствор** (реакционная среда, содержащая ионы Mg^{2+} , необходимые для поддержания активности фермента).

Компоненты ПЦР

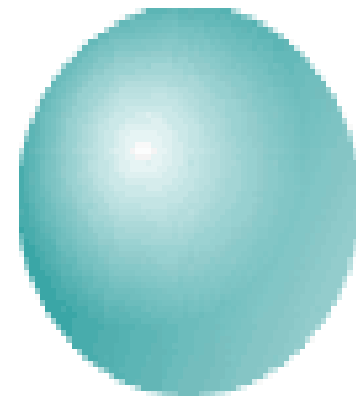


ДНК-матрица

фермент
Taq-полимераза



олигонуклеотидные
затравки (праймеры)



Компоненты ПЦР

Для определения специфических участков генома РНК-содержащих вирусов, сначала получают ДНК-копию с РНК-матрицы, используя реакцию обратной транскрипции (RT), катализируемую ферментом ревертазой (обратной транскриптазой).

Для получения достаточного количества копий
искомого характеристического фрагмента ДНК
амплификация включает 20-40 циклов

Этапы амплификации

1 этап: Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали).

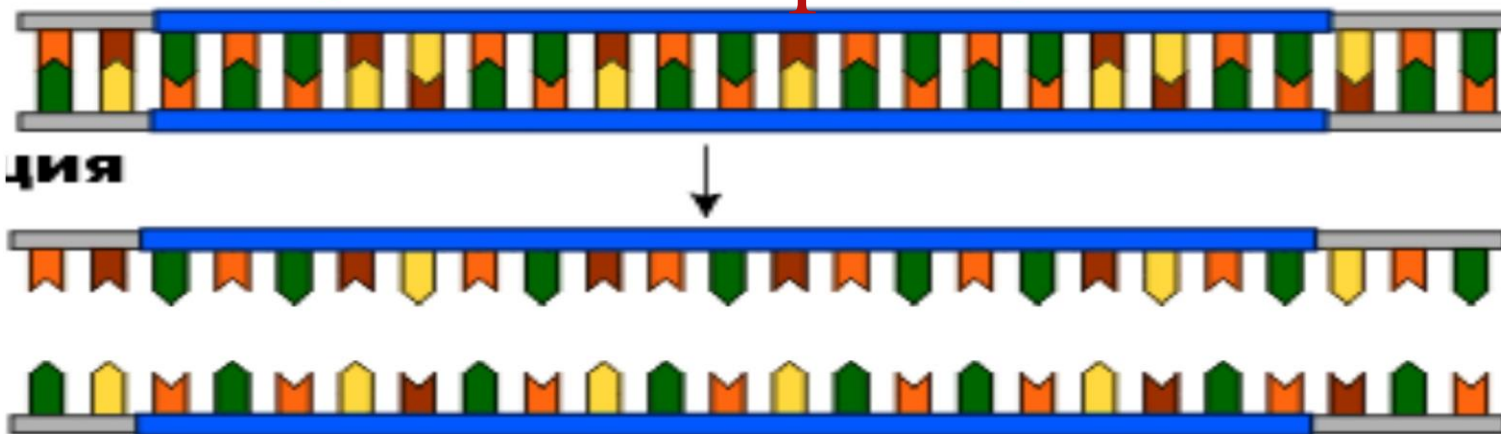
Протекает при $93-95^{\circ}\text{C}$ в течение 30-40 сек.

2 этап: Присоединение праймеров (отжиг) происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига в интервале $50-65^{\circ}\text{C}$. Время отжига 20-60 сек.

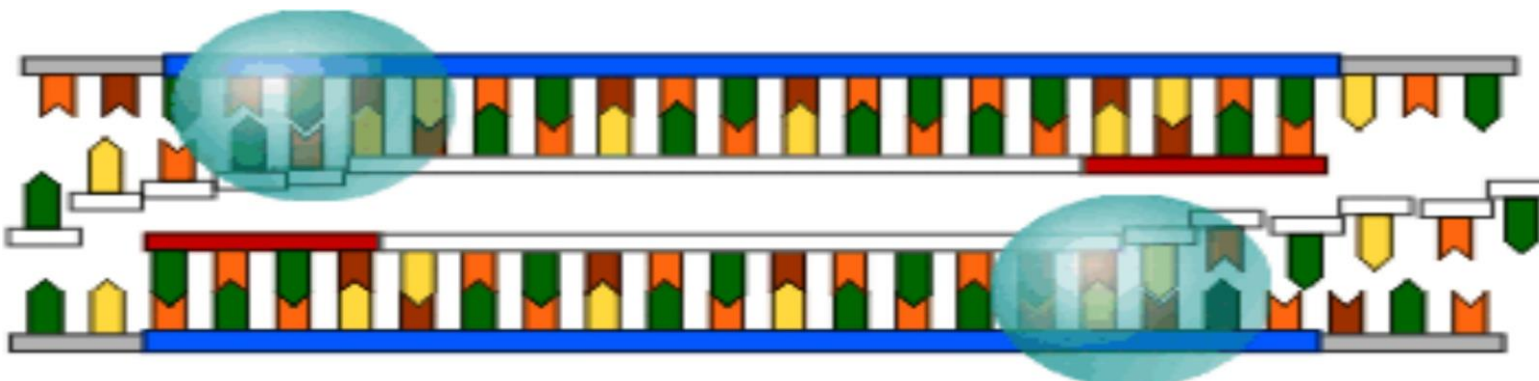
3 этап: Дистраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ). Процесс синтеза катализируется термостабильной ДНК-полимеразой (Taq-полимеразой), проходит при температуре $70-72^{\circ}\text{C}$. Время протекания синтеза 20-40 сек.

1-ый цикл амплификации

1-й этап
Денатурация
93 95 98



2-й этап
ОТЖКиров
прайм-меров
50 65 72

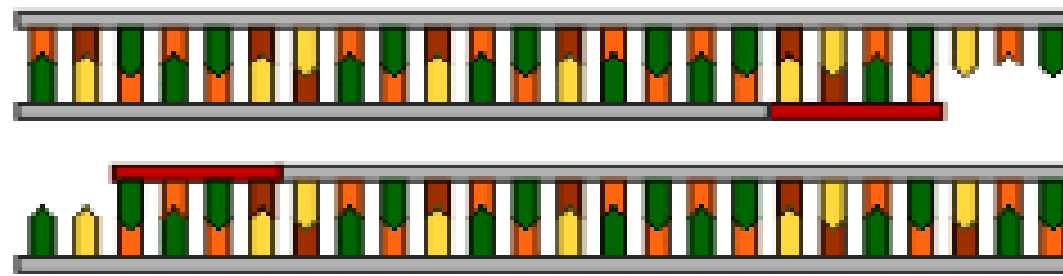


Этапы ПЦР

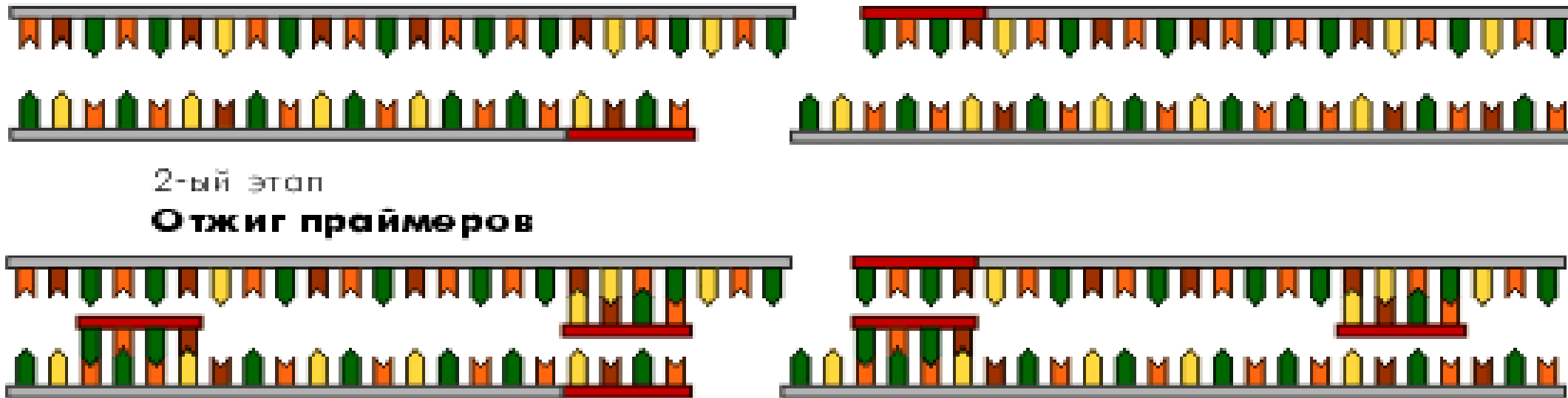
Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (**ампликона**). В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей. Происходит накопление ампликонов в растворе по формуле 2^n , где n -число циклов амплификации. Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции этого фрагмента методом электрофореза в агарозном геле.

2-ой цикл амплификации

1-ый этап
Денатурация



2-ый этап
Отжиг праймеров



3-ий этап
Синтез цепи ДНК



← Продукты амплификации (ампликоны) →

Этапы ПЦР

Процесс амплификации проводится в специальном программируемом термостате (**амплификаторе**), который по заданной программе автоматически осуществляет смену температур согласно числу циклов амплификации

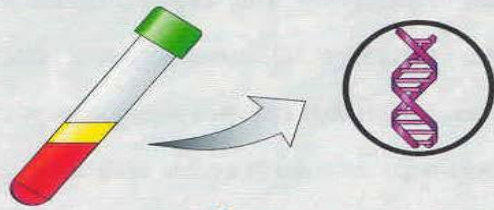


Анализ с использованием ПЦР включает:

1. Выделение ДНК (РНК) из клинического образца •
2. Амплификацию специфических фрагментов ДНК
3. Детекцию продуктов амплификации

Стадии ПЦР

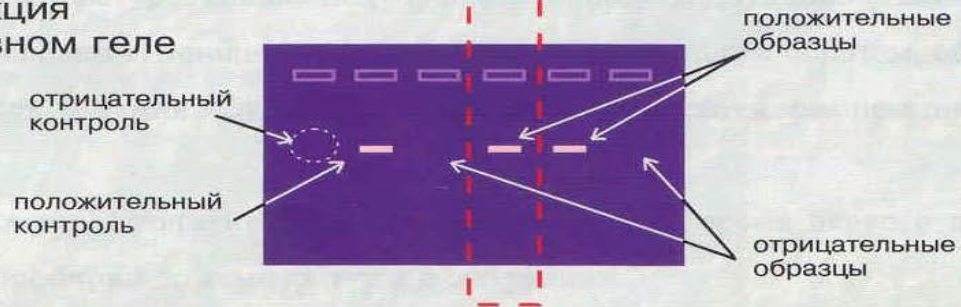
1. Выделение ДНК



2. Амплификация



3. Детекция в агарозном геле



Выделение ДНК (РНК)

Клиническая проба подвергается специальной обработке, в результате которой происходит лизис клеточного материала, удаление белковых и полисахаридных фракций, получение раствора ДНК или РНК, свободной от ингибиторов и готовой для амплификации. Выбор методики выделения ДНК (РНК) определяется характером обрабатываемого клинического материала.

Амплификация специфических фрагментов ДНК

Накопление коротких специфических фрагментов ДНК в количестве, необходимом для их дальнейшей детекции. В большинстве методик определения специфических фрагментов генома используется т. н. «классический вариант направленной ПЦР». Для повышения специфичности и чувствительности анализа в некоторых методиках используется метод «гнездной» (**nested**) ПЦР, в котором используются 2 пары праймеров (**«внешние» - для первой стадии, и «внутренние» - для второй стадии**).

Разновидности полимеразной цепной реакции:

- с «горячим» стартом (hot-start PCR),
- мультиплексная (мультипраймерная),
- гнездовая («вложенная», nested PCR),
- «инвертированная», ассиметричная, метод молекулярных колоний, длинных фрагментов (Long-range PCR),
- с быстрой амплификацией концов кДНК (RACE-PCR),
- универсальная (broad-range PCR),
- с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, RT-PCR),
- иммуно-ПЦР (immuno-PCR-IPCR),
- в режиме «реального времени» (Real-Time PCR),
- анализ «по конечной точке» (End-point PCR) и т. д.

Детекция продуктов амплификации нуклеиновых кислот:

- электрофоретический метод (в агарозном или полиакриламидном геле);
- гибридизационно-ферментный метод;
- гибридизационно-флуоресцентный метод (детекция продукта в режиме «реального времени» или регистрация продукта после окончания реакции амплификации («анализ по конечной точке»)).

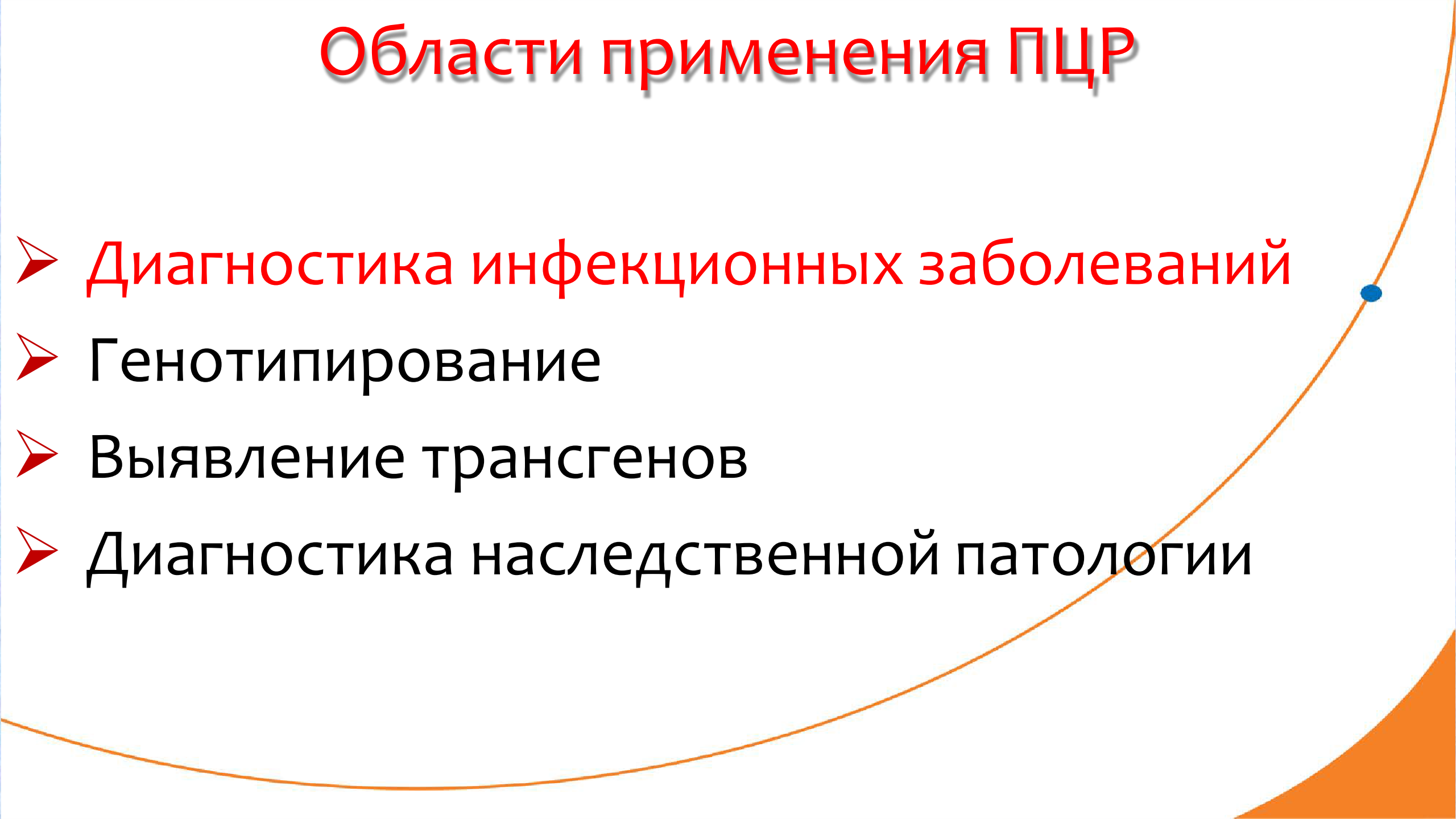
Детекция продуктов амплификации

В большинстве методик проводится разделение смеси продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. До проведения электрофоретического разделения, к амплификационной смеси добавляется раствор бромистого этидия, образующий с двухцепочечными фрагментами ДНК прочные соединения внедрения. Эти соединения под действием УФ-облучения способны флуоресцировать, что регистрируется в виде оранжево-красных светящихся полос после электрофоретического разделения амплификационной смеси в агарозном геле.

Преимущества ПЦР

Параметр	Характеристика
Высокая чувствительность.	Выявляет единичные клетки и вирионы.
Высокая специфичность.	Определяет уникальный фрагмент ДНК патогена, детерминирующий его видовые, токсигенные и другие отличительные свойства.
Быстрота получения результатов	2-6 часов от начала исследования.
Универсальность процедуры проведения реакции	Практически для всех известных возбудителей инфекционных заболеваний стандартная процедура проведения реакции.
Исследование клинического материала	Не требуется выделение чистой культуры и накопление биомассы.
Диагностика различных патологических процессов	Острые, хронические, латентные, медленные инфекции.
Диагностика микробов любых видов	Культивируемые, некультивируемые, персистирующие формы.

Области применения ПЦР

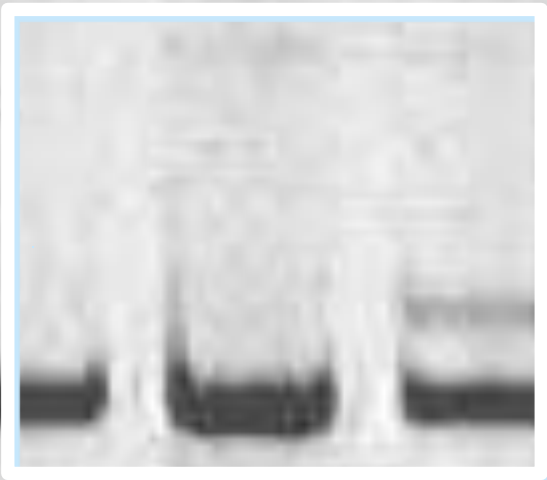
- Диагностика инфекционных заболеваний
 - Генотипирование
 - Выявление трансгенов
 - Диагностика наследственной патологии
- 

Применение методов амплификации нуклеиновых кислот микроорганизмов I-IV групп патогенности:

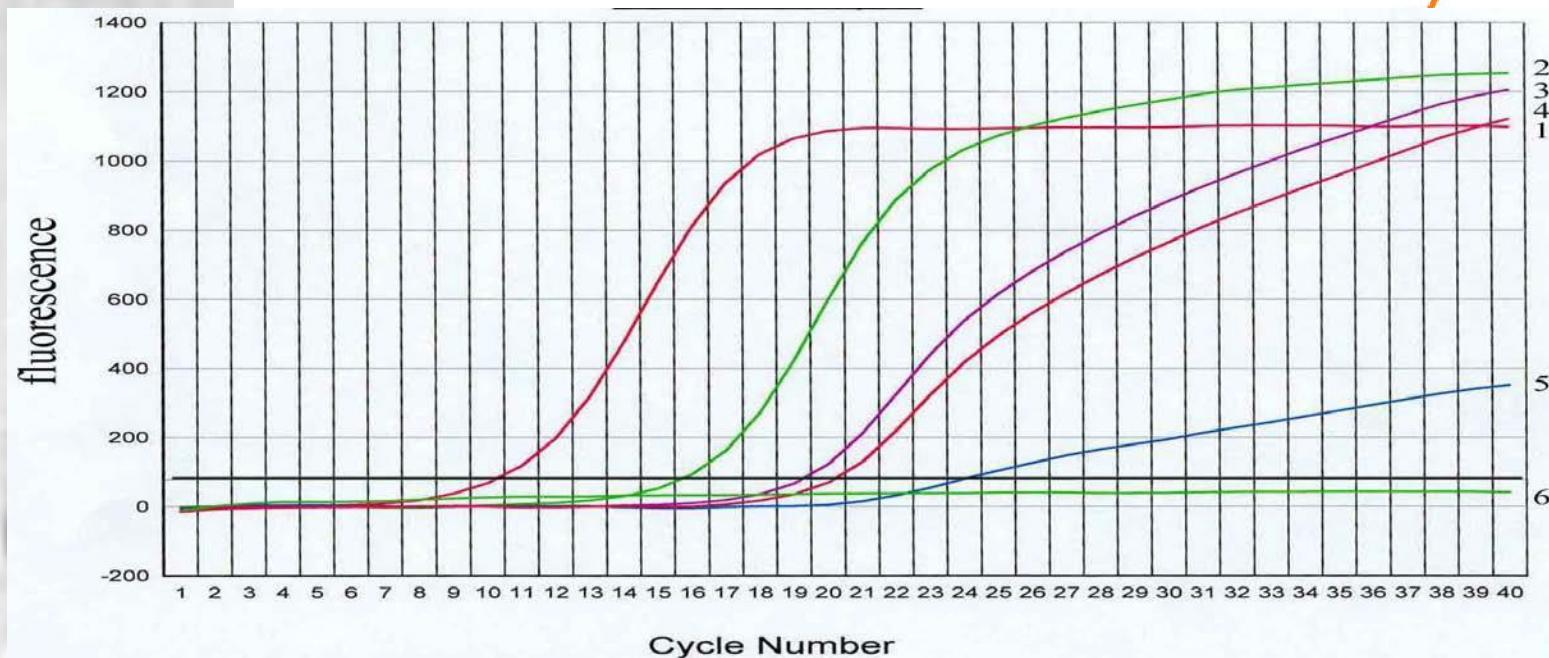
- метод экспресс-диагностики при исследовании биологического материала, взятого от человека с целью детекции у него ДНК/РНК микроорганизмов I-IV групп патогенности и их количественной оценки;
- метод специфической индикации ПБА в объектах окружающей среды и пищевых продуктах;
- ускоренный предварительный тест при выполнении культурального и биологического методов исследования и для идентификации чистых культур;
- определение эпидемиологической значимости изолятов на основе выявления генетических маркёров патогенности, антибиотикоустойчивости;
- таксономическая характеристика штаммов на основе выявления специфических видовых, родовых и других маркёров;
- генотипирование штаммов с целью определения их происхождения;
- прогнозирование течения инфекционного заболевания и оценка эффективности проводимой терапии.

Варианты ПЦР

анализ по конечной точке



анализ «в реальном времени»



Что такое ПЦР «в реальном времени»?

1. «Real-time» ПЦР (**широкое понятие**) – ПЦР с регистрацией накопления ДНК во время амплификации (**синонимы: Real-Time PCR, «флуоресцентная» ПЦР**).
2. «Real-time» ПЦР (**узкое понятие**) – модификации ПЦР, в которых измерение флуоресценции непосредственно во время реакции используется для количественного анализа (**синонимы: quantitative PCR (qPCR), kinetic PCR**).

Особенности Real-Time PCR

- Позволяет проводить количественный анализ (ДНК, кДНК, РНК)
- Повышает достоверность исследования за счёт использования олигонуклеотидных зондов
- Уменьшает риск контаминации продуктами ПЦР
- Снижает требования к организации лаборатории
- Сокращает время исследования
- Упрощает ведение документации и трактовку результатов исследования

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP)

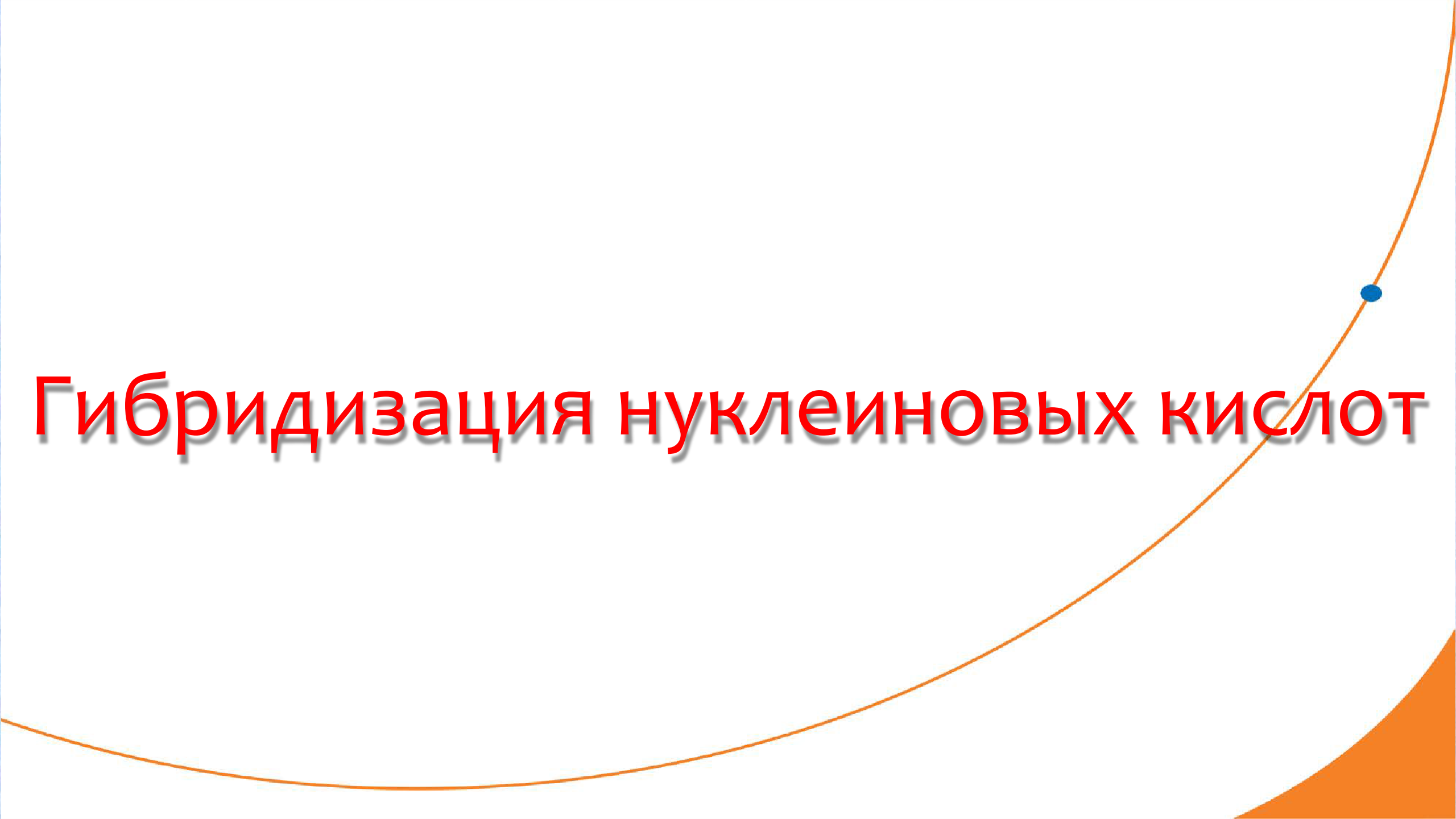
LAMP

Технологические преимущества LAMP - амплификация при постоянной температуре 60-65° C (что исключает необходимость использования термоциклера), более быстрое получение результата при сохранении аналогичной чувствительности и специфичности. Важными достоинствами являются высокая экономичность и простота выполнения с возможностью выявления амплификационного продукта и оценки результата визуально, по изменению цвета после добавления одного из интеркалирующих красителей. Современные модификации технологии RT-LAMP позволяют получать количественный результат в режиме реального времени

Сравнение методов LAMP и классической ПЦР

Критерии	LAMP	ПЦР
Температурные циклы	Изотермальная амплификация (60-65° C)	Необходимость различных температурных циклов
Количество праймеров	4(6) специально разработанных праймеров	2 праймера
Время анализа	До 30 мин	2-4 часа
Выход ДНК	Выход ДНК - 10-20 мкг	Выход ДНК - до 0,2 мкг
Визуальная детекция	Возможна	Невозможна
Экономичность и простота выполнения	Экономичный и прост в выполнении	Требует дорогостоящего оборудования и подготовленных специалистов
Чувствительность к ингибиторам пробы	Нечувствительна	Чувствительна
Возможность мультиплексирования	Возможно	Невозможно
Известность метода, оценка в клинических условиях	Малоизвестен, клиническая оценка продолжается	Хорошо известен, клиническая эффективность доказана

Гибридизация нуклеиновых кислот

A decorative orange curve starts from the bottom left, curves upwards, and ends at the top right. A small blue dot is located on the upper part of this curve.

Гибридизация нуклеиновых кислот

- Принцип метода обусловлен способностью ДНК специфически гибридизировать (**соединяться**) с комплементарными фрагментами искусственно созданных нитей ДНК, меченных изотопами или ферментами.
- Метод основан на способности двухцепочечной ДНК при повышенной температуре (90°C) денатурировать, т. е. расплетаться на две нити, при понижении температуры на 10°C вновь восстанавливать исходную структуру.
- Требуется наличие молекулярного зонда (**одноцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, меченной радиоизотопом или ферментом**) с которой сравнивают исследуемую ДНК.

Гибридизация нуклеиновых кислот

Для проведения МГ исследуемую ДНК расплетают указанным способом, одну нить фиксируют на специальном фильтре, который затем помещают в раствор, содержащий зонды. Создаются условия, благоприятные для образования двойной спирали. В случае комплементарности между зондом и исследуемой ДНК, они образуют между собой двойную спираль.

Биочипы



В последнее десятилетие существенное развитие получила технология анализа сложных биологических систем с помощью биологических микрочипов. При их создании сочетается принцип миниатюризации и многофакторного анализа. Принцип миниатюризации ведёт к повышению производительности исследований и снижению себестоимости анализа. Принцип многофакторности повышает достоверность результатов анализа

Биочипы

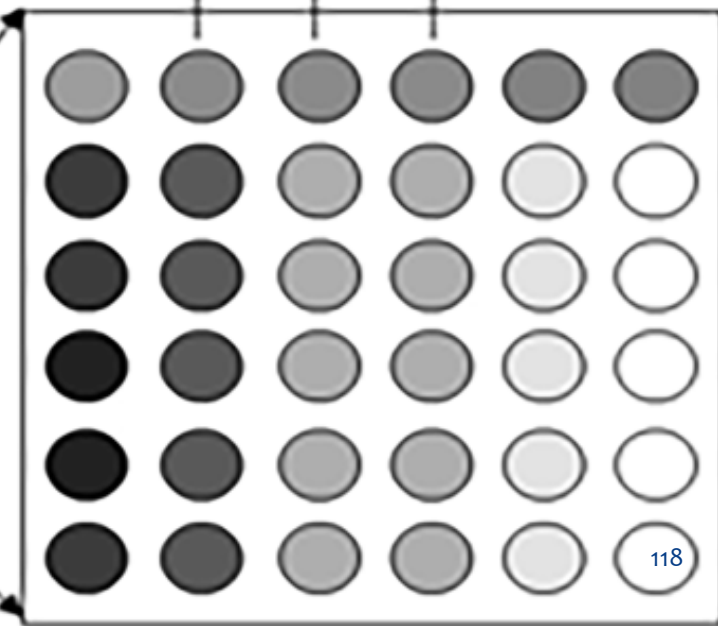
Главным элементом микрочипа является матрица микроячеек - эррей. Функциональная единица эррея - спот - содержит уникальный индивидуальный зонд, специфичный к конкретной биологической молекуле или её фрагменту. Зондами могут служить фрагменты геномной ДНК или РНК, белки, олигосахариды и др. Объём капли для формирования спота измеряется пиколитрами, его диаметр составляет 50-300 мкм. Споты располагаются упорядоченными рядами. Количество эрреев на микрочипе и количество спотов в пределах эррея зависят от задач исследования и могут варьировать.

Схема микрочипа

В зависимости от вида материала, сорбированного на подложке, микрочипы разделяют на ДНК-чипы, белковые чипы, клеточные, тканевые микрочипы. Матрицы, где в качестве зондов иммобилизованы белковые молекулы, называются «белковыми чипами» или «иммуночипами».

эррей-зона исследования
одного образца

споты – ячейки с зондами



Стрелками обозначены эррей и отдельные споты

Биочипы

В ячейках биологических микрочипов можно иммобилизовать **тысячи** различных химических веществ, служащих зондами (**олигонуклеотиды, белки, рецепторы, лиганды, антигены и др.**).

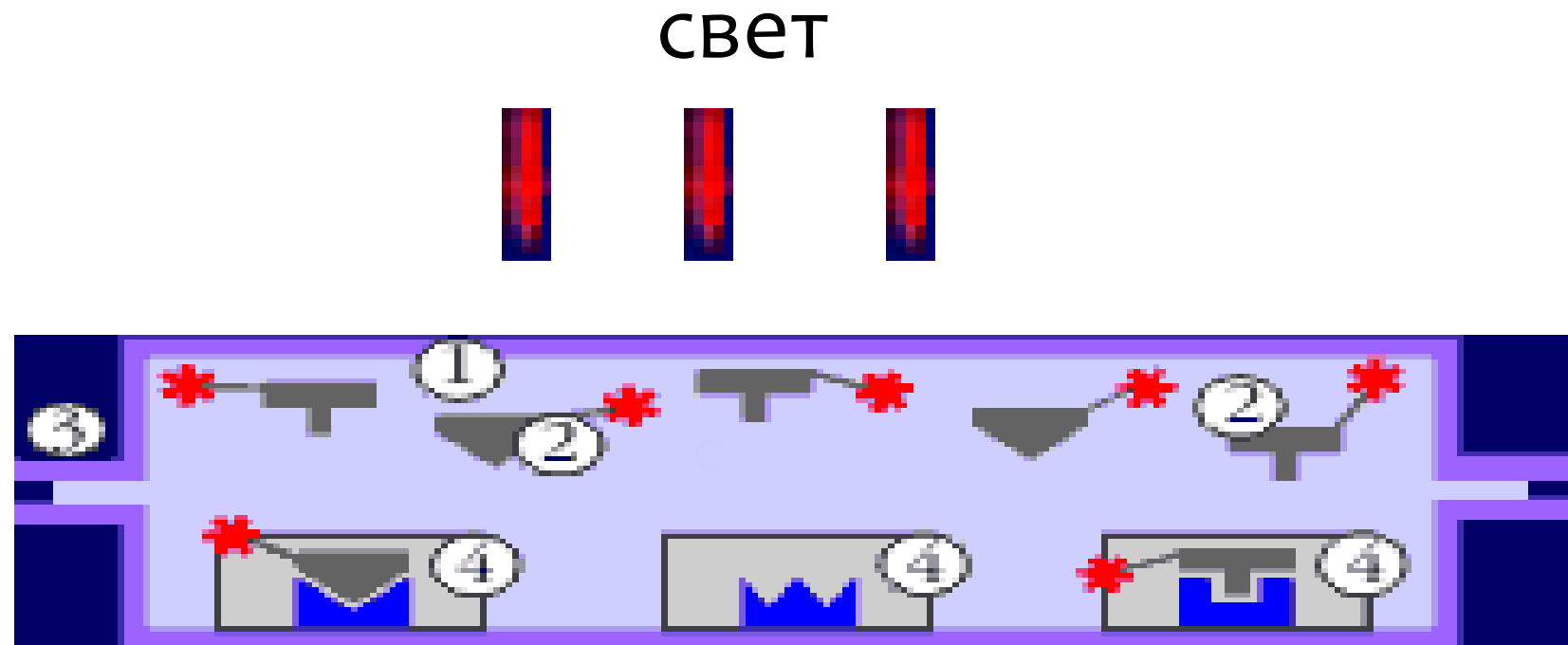
Биочипы

Зонды очищаются и анализируются качественно и количественно до иммобилизации. Зонды в ячейках могут находиться в условиях, близких к их состоянию в растворах.

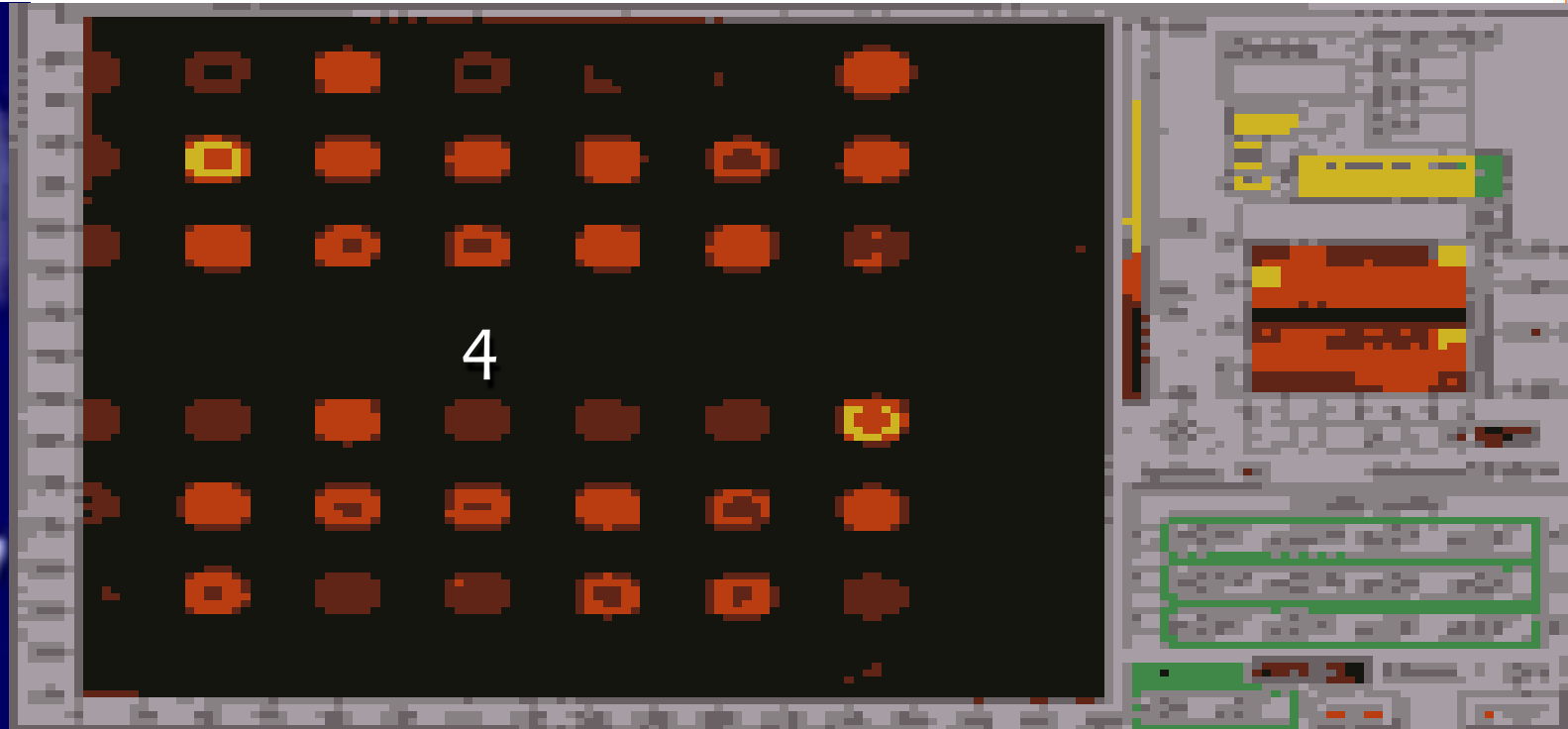
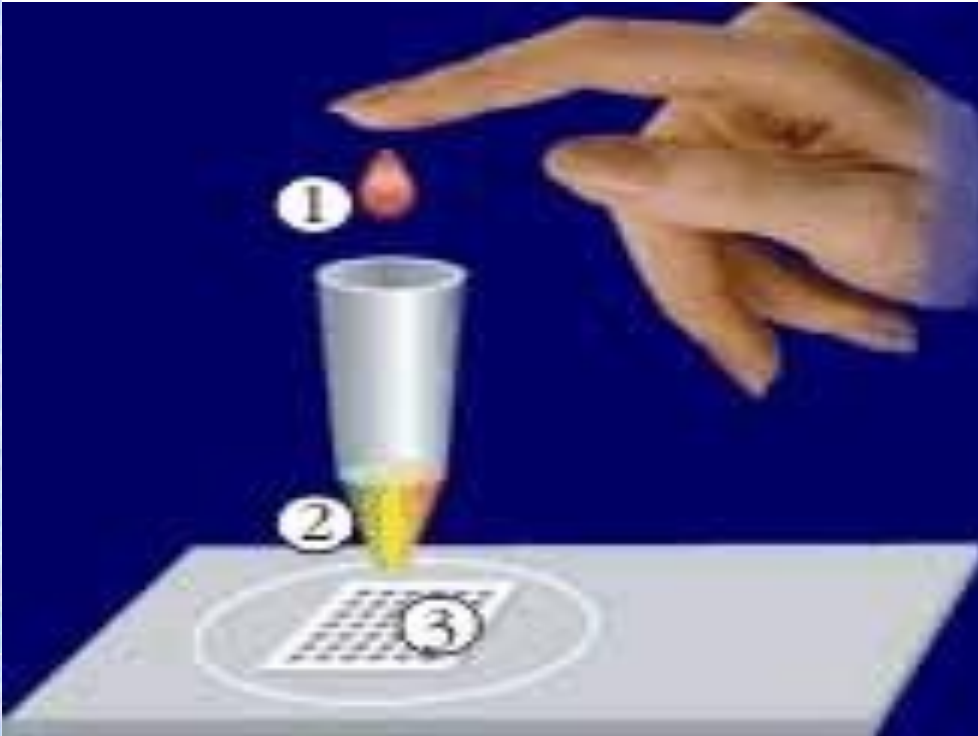
Биочипы

Результат анализа образца определяется индивидуальным рисунком свечения отдельных ячеек микрочипа, который регистрируется с помощью специального оборудования - чип-ридера. Современные чип-ридеры включают в себя несколько лазеров и фильтров, позволяющих регистрировать флуоресцентные сигналы различных флуорофоров, после чего полученная информация обрабатывается и переводится в цифровые значения соответствующими компьютерными программами.

Принцип работы биологических микрочипов



1. стеклянная крышка
2. люминесцентно-меченные молекулы анализируемого образца
3. трубка для подачи раствора анализируемого образца
4. ячейки геля с химическими связанными молекулярными зондами



1. Забор анализируемого образца
2. Обработка образца
3. Взаимодействие образца с иммобилизованными зондами биологического микрочипа
4. Анализ биочипа™ после взаимодействия с образцом.

- Картина распределения свечения ячеек микрочипа является индивидуальной характеристикой анализируемого образца
- Управляющая программа контролирует эксперимент, обрабатывает данные в реальном режиме времени и отображает их на экране монитора

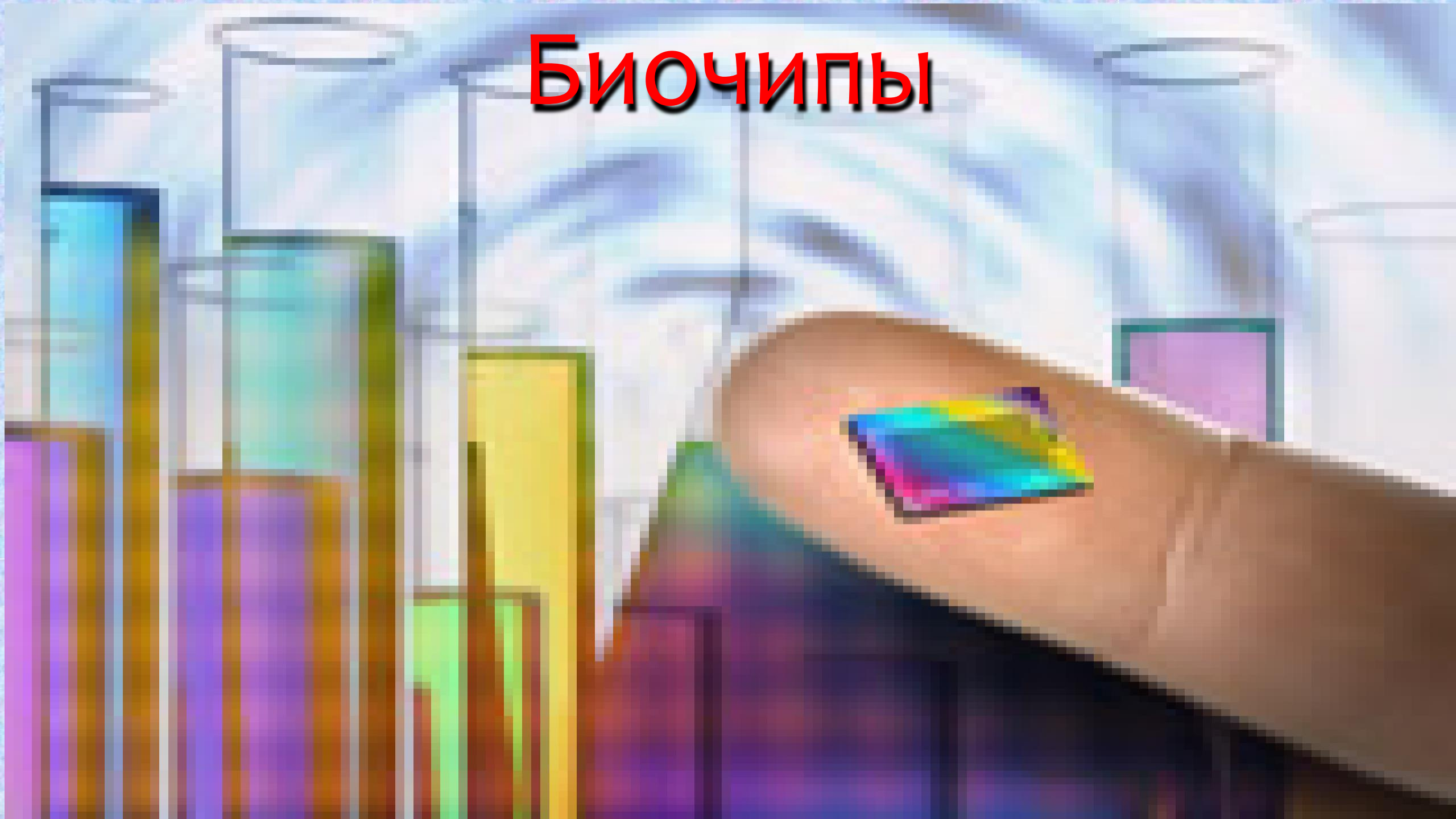
Компоненты комплексной системы анализа

Портативный прибор для
использования в медицинской
диагностике

Исследовательский
анализатор биологических
микрочипов

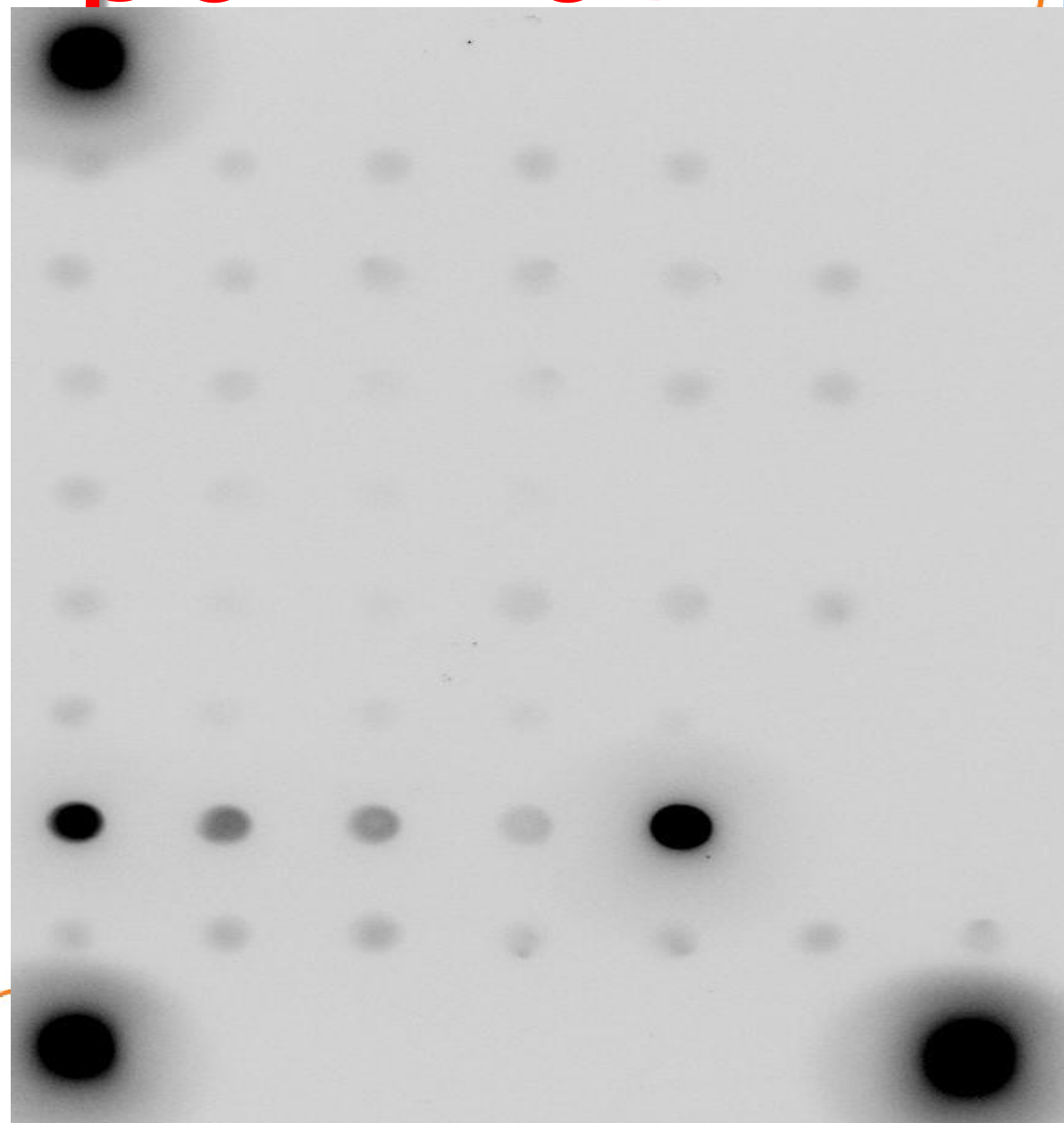
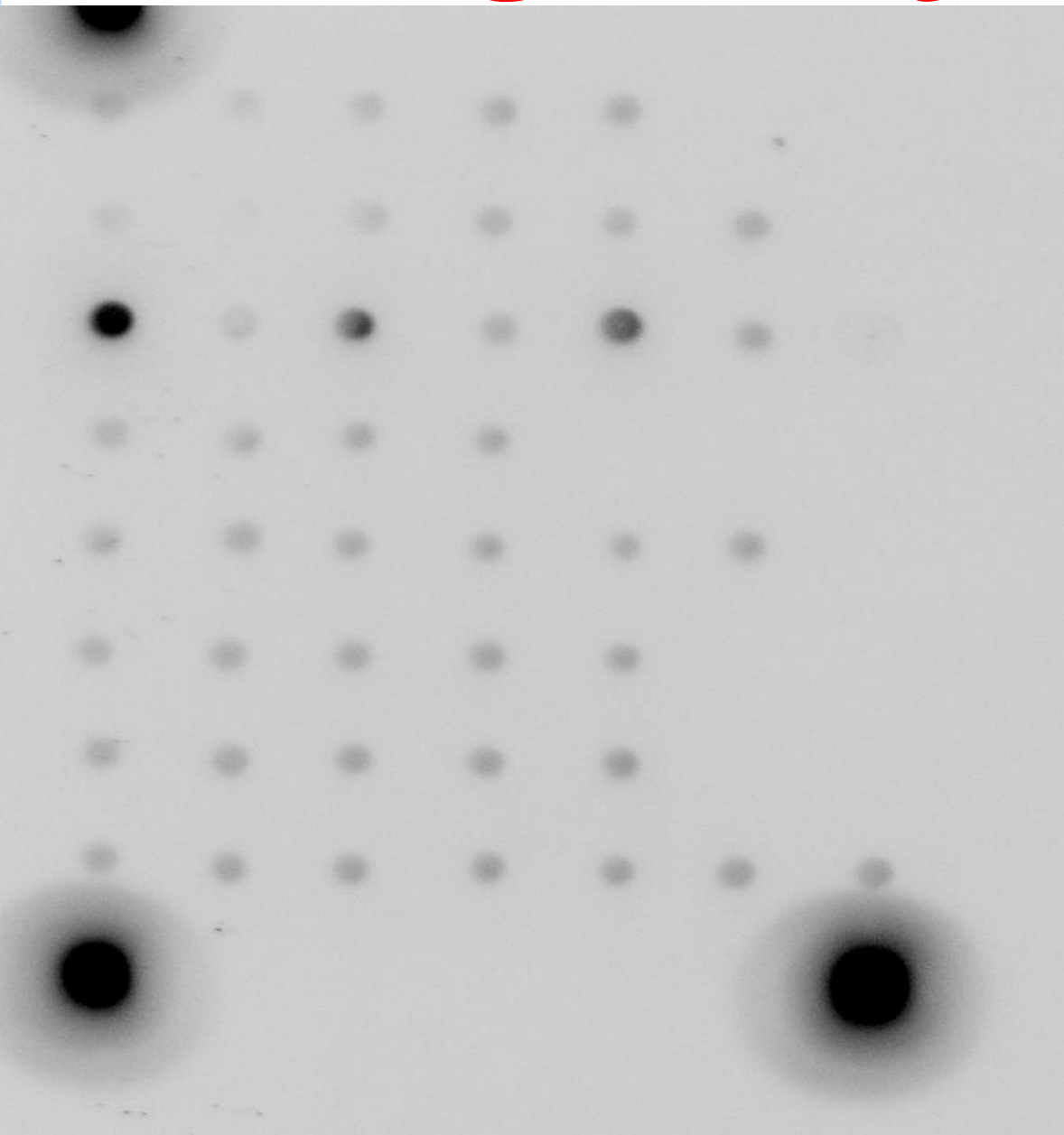


Биочипы

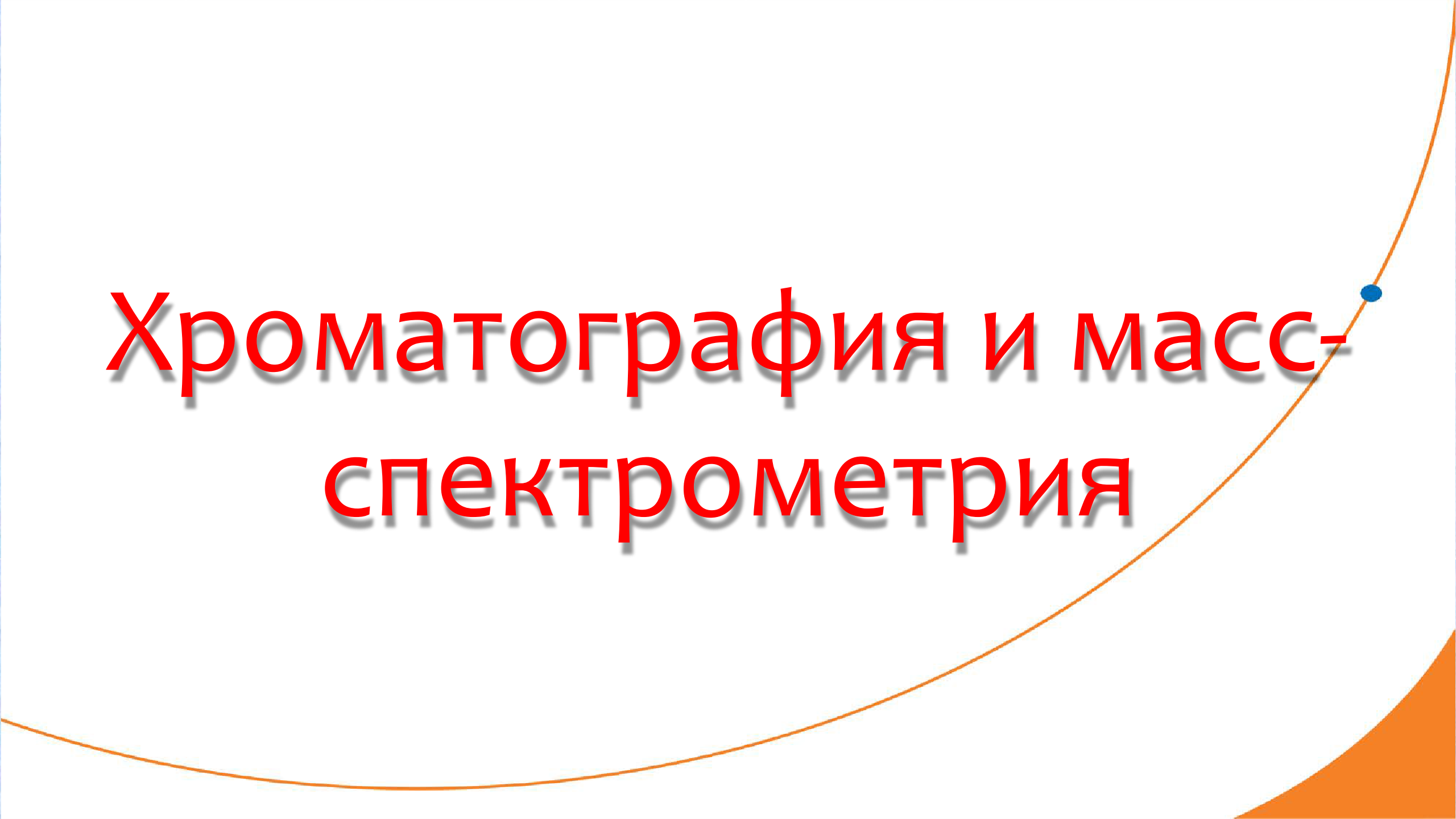


Биологические микрочипы имеют площадь порядка $\frac{1}{4}$ см². Каждый биочип содержит 128 гомогенных «лунок» по 100 мкм диаметром. В ячейках биочипов можно иммобилизовать тысячи различных химических веществ, служащих зондами (**олигонуклеотиды, белки, рецепторы, лиганды и др.**). Зонды очищаются, качественно и количественно анализируются до иммобилизации. Зонды в ячейках находятся в условиях, близких к их состоянию в растворах. Трёхмерная структура ячеек геля обеспечивает высокую интенсивность регистрируемого сигнала. Биочипы позволяют осуществлять параллельно тысячи химических и ферментативных реакций. Результат анализа образца определяется индивидуальным рисунком свечения отдельных ячеек микрочипа, который регистрируется с помощью специальной аппаратуры. Оптический анализ результатов исследований может быть заменен измерениями электрических токов в зависимости от свойств испытуемых образцов.

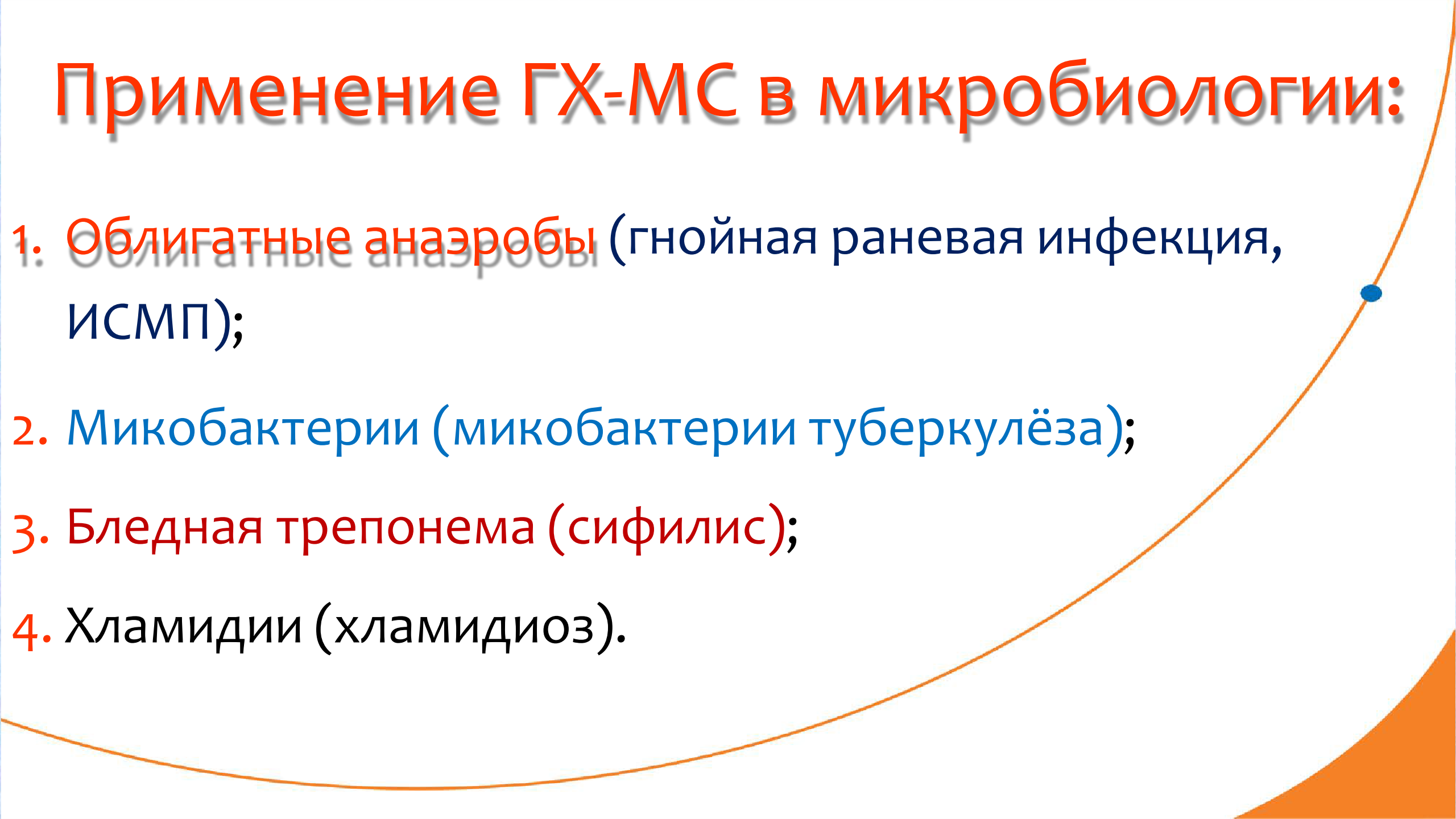
Техника микрочипов



Хроматография и масс- спектрометрия

A decorative orange curve starts from the bottom left, arcs upwards and to the right, ending near the top right corner. A small blue dot is positioned on this curve, just above the end of the main text.

Применение ГХ-МС в микробиологии:

1. **Облигатные анаэробы** (гнойная раневая инфекция, ИСМП);
 2. **Микобактерии** (микобактерии туберкулёза);
 3. **Бледная трепонема** (сифилис);
 4. **Хламидии** (хламидиоз).
- 

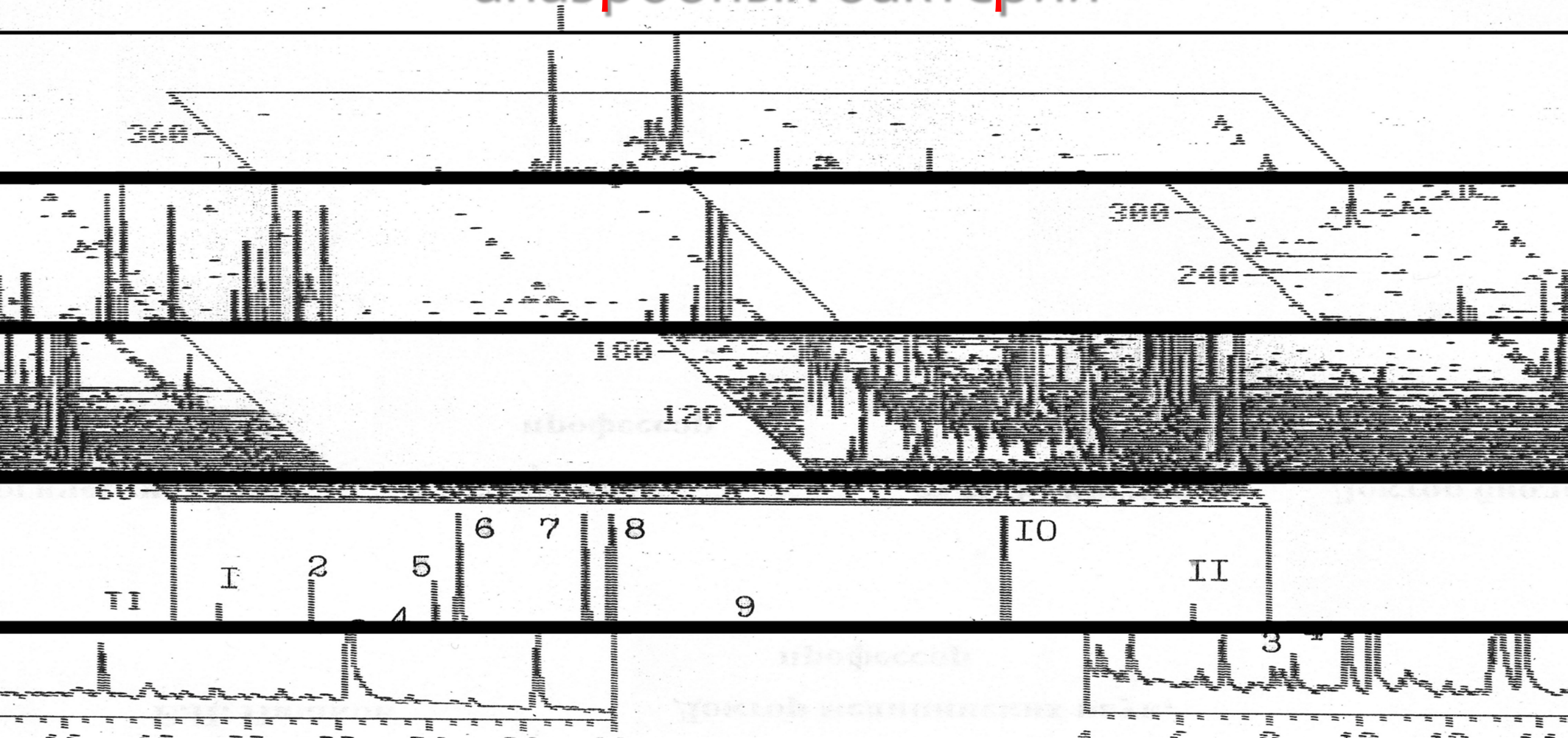
Хроматомасс-спектрометрическая система Agilent Technologies 6890 с масс- селективным детектором MSD-5973



Использование ГХ-МС в анаэробной бактериологии

- **Экспресс-диагностика анаэробной инфекции**, основанная на индикации в исследуемом материале от больного (**гной, ликвор, кровь и т. д.**) молекулярных маркёров облигатных анаэробных бактерий.
- **Хемотаксономия и классификация** облигатных анаэробных бактерий. В 10-ом издании Bergey's manual большинство описаний родов включает конечные продукты метаболизма как критерии для помещения микробов в определённый род и вид.
- **Видовая идентификация** анаэробов, основанная на многокомпонентном анализе всех продуктов бактериального метаболизма и сравнении полученного хроматографического профиля с библиотекой типовых хроматографических профилей.
- **Изучение патогенетических механизмов** взаимодействия микроба и организма на молекулярном уровне, что позволяет судить о степени реального участия анаэробов в патологическом процессе и об эффективности проводимого лечения.
- Ускоренное **определение чувствительности** анаэробов к химиотерапевтическим препаратам.

Хроматограмма молекулярных маркёров анаэробных бактерий





РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

КОМИТЕТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ПАТЕНТАМ
И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ
(РОСПАТЕНТ)

ПАТЕНТ

№ 2074258

на ИЗОБРЕТЕНИЕ

"Способ определения чувствительности анаэробных
микроорганизмов к антимикробным химиотерапевтическим
препаратам"

Патентообладатель (ли): Миронов Андрей Юрьевич

Автор (авторы): Миронов Андрей Юрьевич и Истратов Валерий
Григорьевич

Приоритет изобретения 31 марта 1993г.

Дата поступления заявки в Роспатент 31 марта 1993г.

Заявка № 93016780

Зарегистрирован в Государственном
реестре изобретений 27 февраля 1997г.

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ РОСПАТЕНТА

Патент РФ № 2074258 «Способ
определения чувствительности
анаэробных микроорганизмов к
антимикробным
химиотерапевтическим
препаратам»

Использование ГХ в микобактериологии

- **Видовая идентификация** микобактерий, основанная на многокомпонентном анализе всех продуктов бактериального метаболизма и сравнении полученного хроматографического профиля с библиотекой типовых хроматографических профилей.
- **Хемотаксономия** и классификация микобактерий.
- Ускоренное **определение чувствительности** микобактерий к противотуберкулёзным химиотерапевтическим препаратам.

Молекулярные маркёры сифилиса



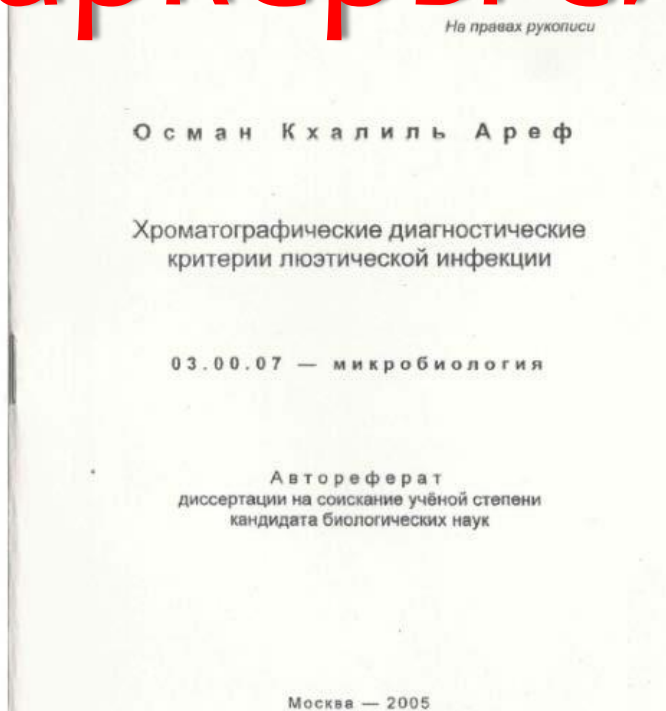
Терехова Юлия Борисовна

Молекулярные маркёры сифи-
литической инфекции

03.00.07 — микробиология

Аннотация
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва — 2008



фосфорная кислота, D-галактоза, D-трентол (D-треоза и её лактон), пировиноградная кислота, метаболиты серотонина и его производных — индолуксусная и индолмасляная кислоты изомеры глюкозы — α - и β -глюкоза, D-манноза, рибоза, N-ацетил-DL-триптофан (ацетилированная форма предшественников серотонина), 4-ацетилморфолин **служат молекулярными маркёрами органических поражений ЦНС при сифилисе**

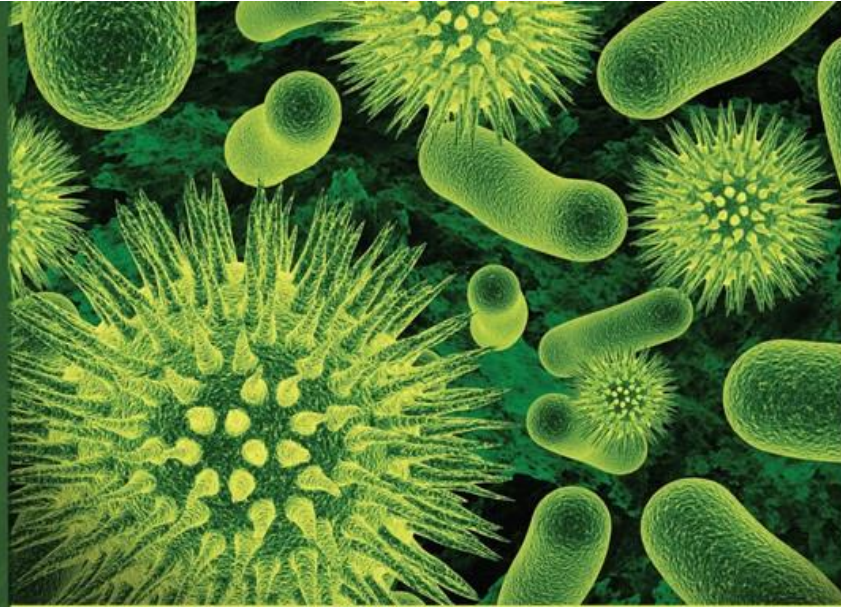
уксусная кислота, 1-1-бензодиокси-5-ол, пропионовая кислота, 2-пропанамида изомасляная кислота, 1-4-дифозил-2, 3-изопропил-L-трентол, масляная кислота, нитробензен; изовалериановая кислота, 4-4-ацетомидо-2, 2, 6, 6-тетрометил-пиперадино-1-оксил; валериановая кислота, ацетамидо-N-аминооксиметил; капроновая, лауриновая кислоты; 2-метил-5-(1-метил-этил)-фенол, 4-4-1-метилэтил-бутил-фенол; фенилуксусная и фенилпропионовая кислоты **служат молекулярными маркёрами органических поражений почек при сифилисе**

Молекулярные маркёры хламидий



**Миронов
Андрей Юрьевич**

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМТН, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова. Автор более 300 научных работ, в том числе 13 учебников, более 20 учебных пособий, 2-х руководств для врачей, 3-х монографий, 5 изобретений и 13 рационализаторских предложений. Лауреат премии Чижевского РАМТН. Кавалер «Золотой звезды Вернадского». Награжден двумя серебряными медалями ВДНХ СССР. Подготовил 2-х докторов и 8 кандидатов наук.



**Зур Наталья
Васильевна**

кандидат медицинских наук, врач-дерматовенеролог высшей категории, врач ФГБУ «Детский медицинский центр» Управления делами Президента РФ. Автор более 70 печатных работ, в том числе 3-х учебных пособий для врачей, 1 изобретения.

Молекулярные маркёры патогенов



Масс-спектрометрия

MALDI-ToF

A decorative orange curve starts from the bottom left, arcs upwards and to the right, ending near the top right corner. A small blue dot is positioned on this curve, just to the right of the main text.

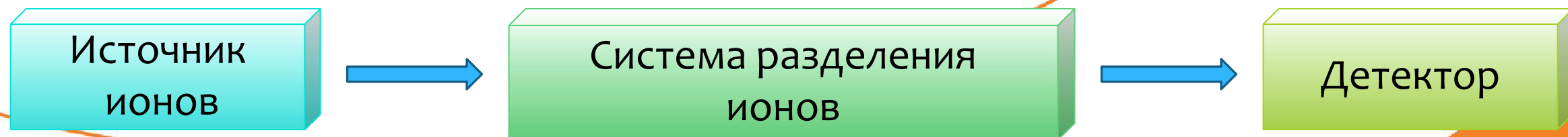
Принцип масс-спектрометрии MALDI-ToF

Масс-спектрометрия (MS) - метод исследования массы (или соотношения массы к заряду $[m/z]$) вещества посредством специальных воздействий электрических и магнитных полей на исследуемое вещество в ионизированной форме

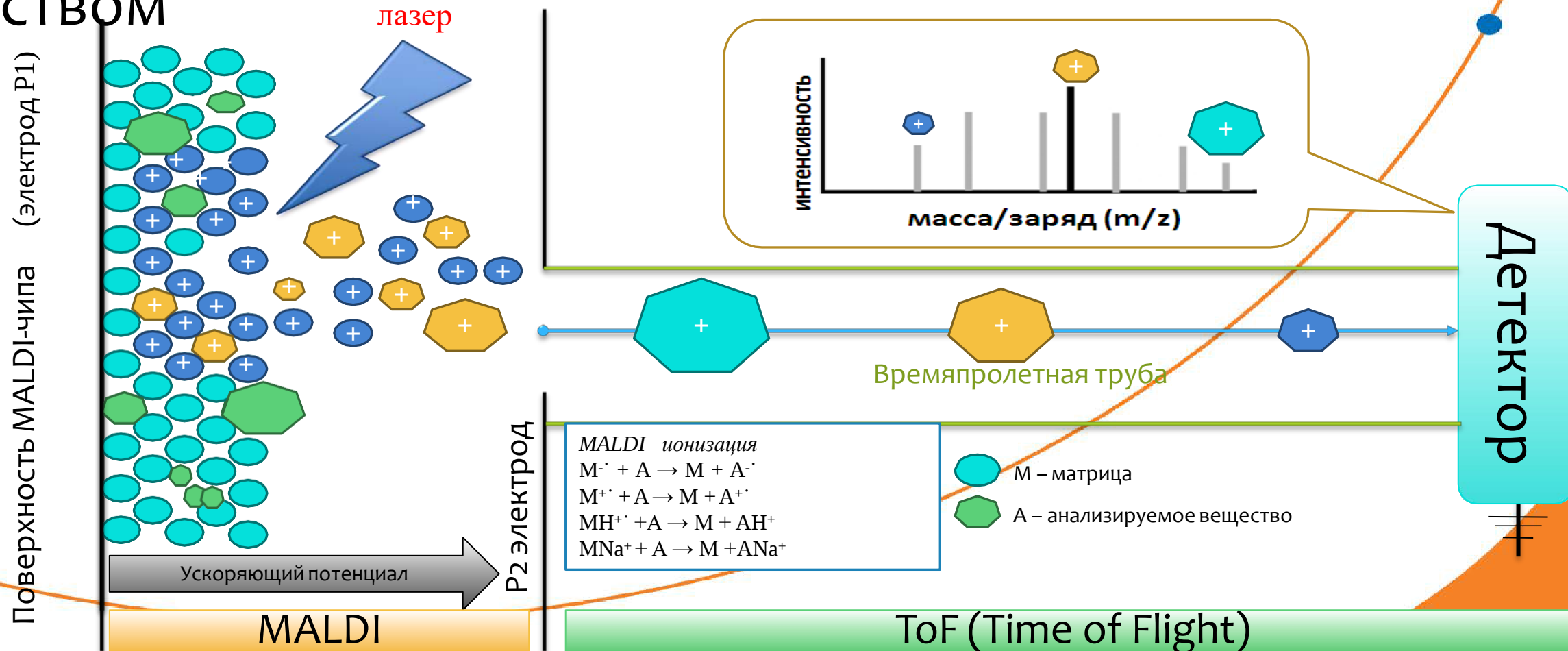
Иными словами:

Масс-спектрометр – высокоточные молекулярные ВЕСЫ

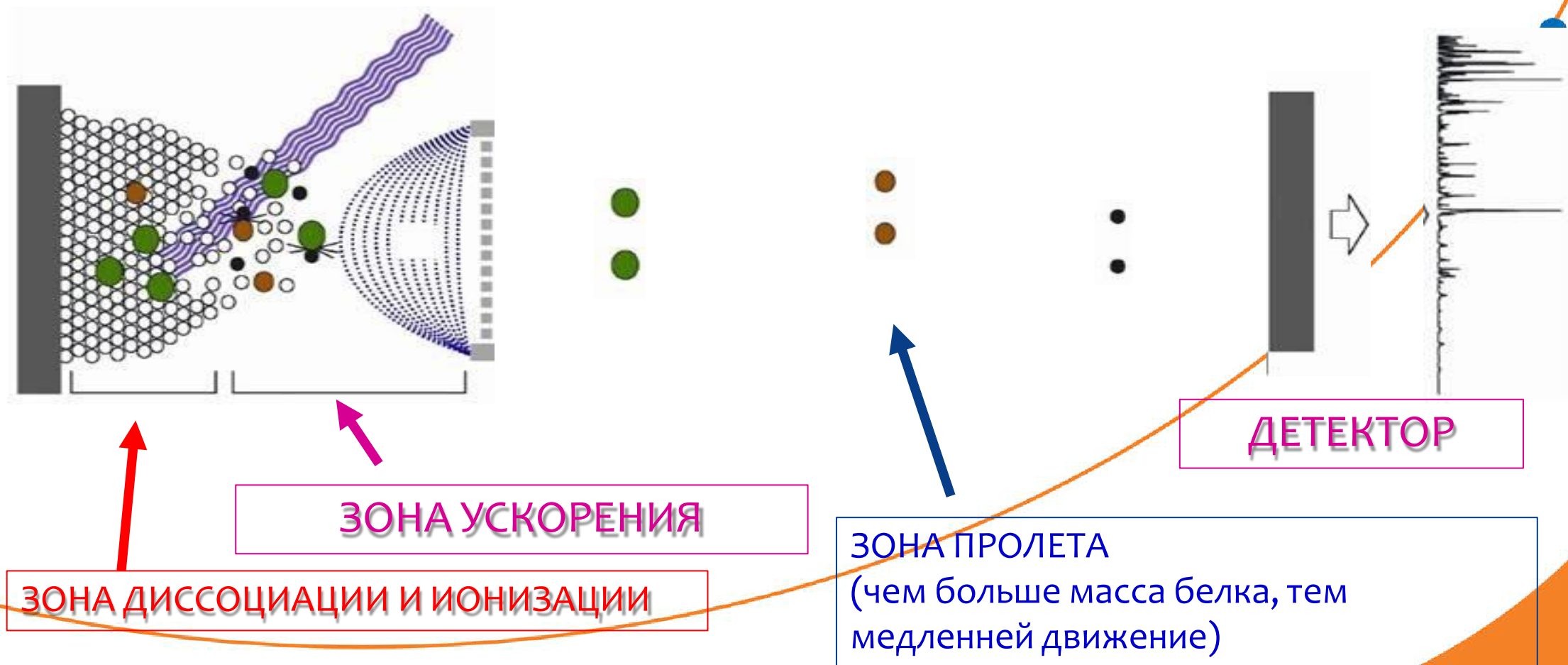
Схема масс-спектрометра в общем виде:



МАЛДИ - Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация - метод «мягкой» ионизации твёрдого вещества, обусловленной воздействием импульсами лазерного излучения на смесь матрицы с анализируемым веществом



Принцип масс-спектрометрии MALDI-ToF – рабочие зоны



Применение MALDI-ToF MS в микробиологии

- Идентификация микроорганизмов по масс-спектру рибосомальных белков
- Белковое профилирование сывороточных и тканевых биомаркёров
- Генотипирование единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP)
- Антибиотикорезистентность
- Генетический риск развития заболеваний человека



• SNP-генотипирование (Genotoools)
MALDI-ToF минисеквенирование

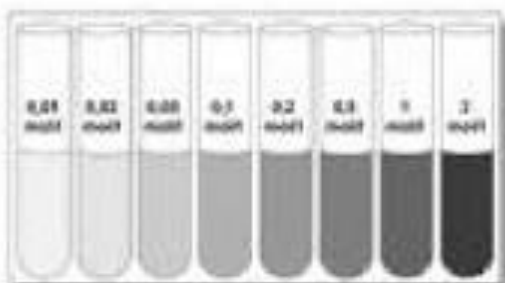
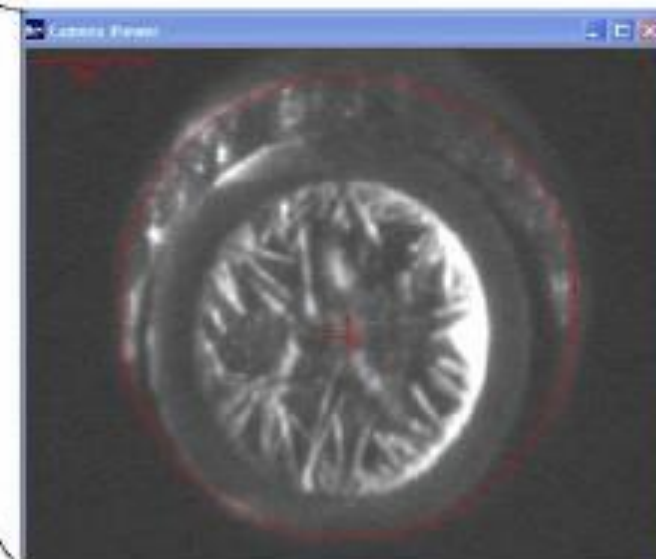
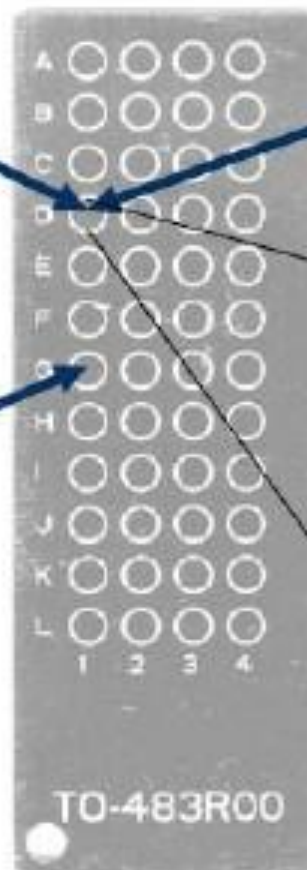
Подготовка образца = 3 шага

1) СТАЛЬНАЯ МАТРИЦА
48 поз = 23 образца (дубли)
+ E. coli K 12 (калибратор)



2) ДОБАВИТЬ 0.5 мкл
матричного раствора

1) перенести одиночную колонию
или суспензию микроорганизмов



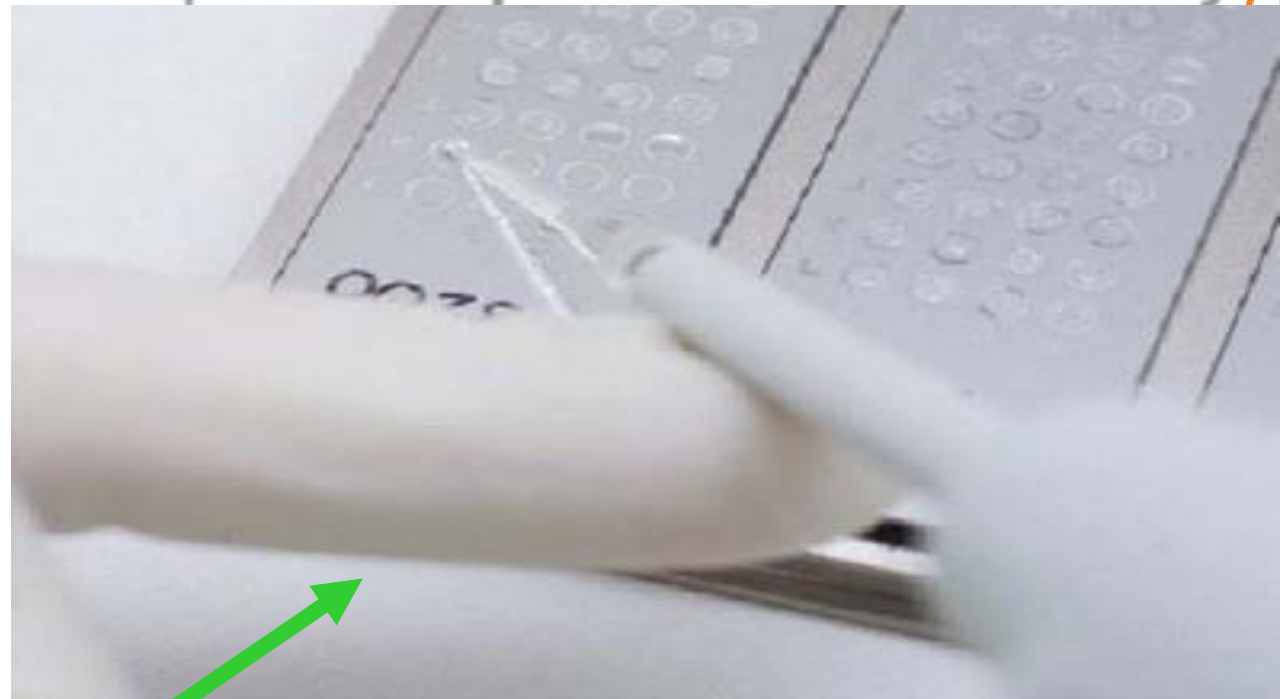
3) кристаллизация при комнатной температуре

Простая подготовка образца = забор материала

Необходима малая часть колонии
(видна на кончике носика)



Простая подготовка образца = перенос в ячейку



Точки на дне ячеек – это и есть перенесённый образец

Внесение матричного раствора
в ячейки (по 0.5 мкл)



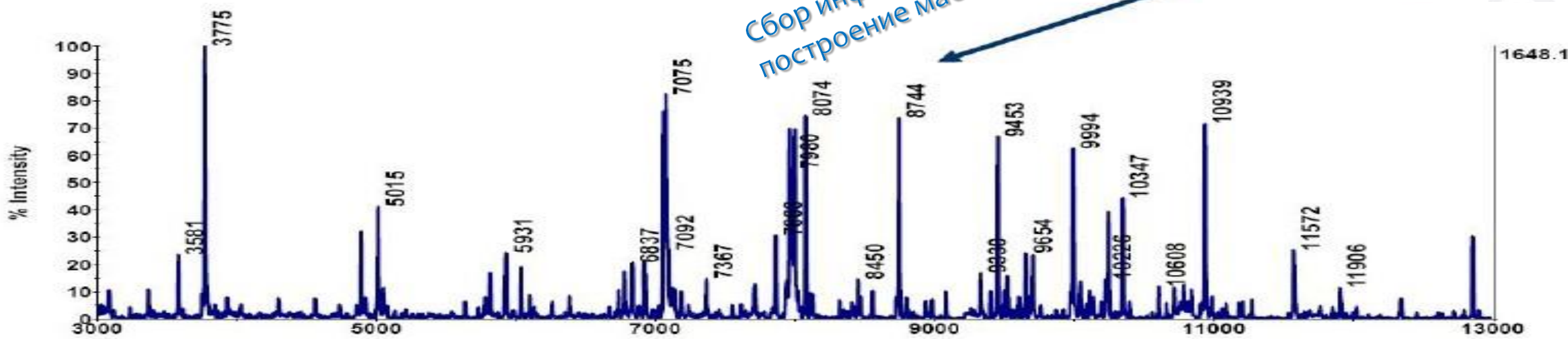
Принцип масс-спектрометрии MALDI-TOF – масс-спектр



50 импульсов лазера для разрушение матрицы, интактной ионизация белков

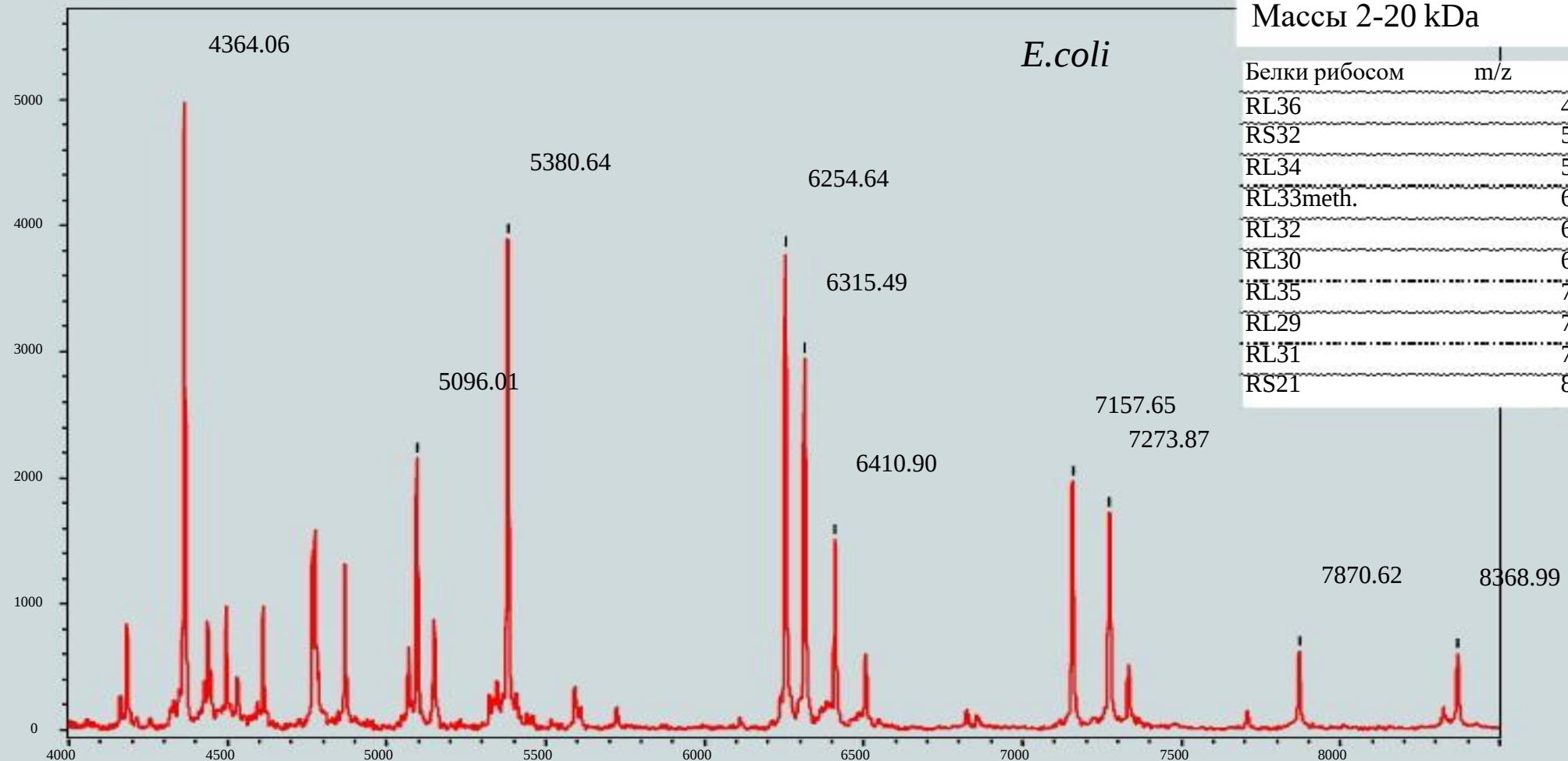


сбор информации с детектора и построение масс-спектра



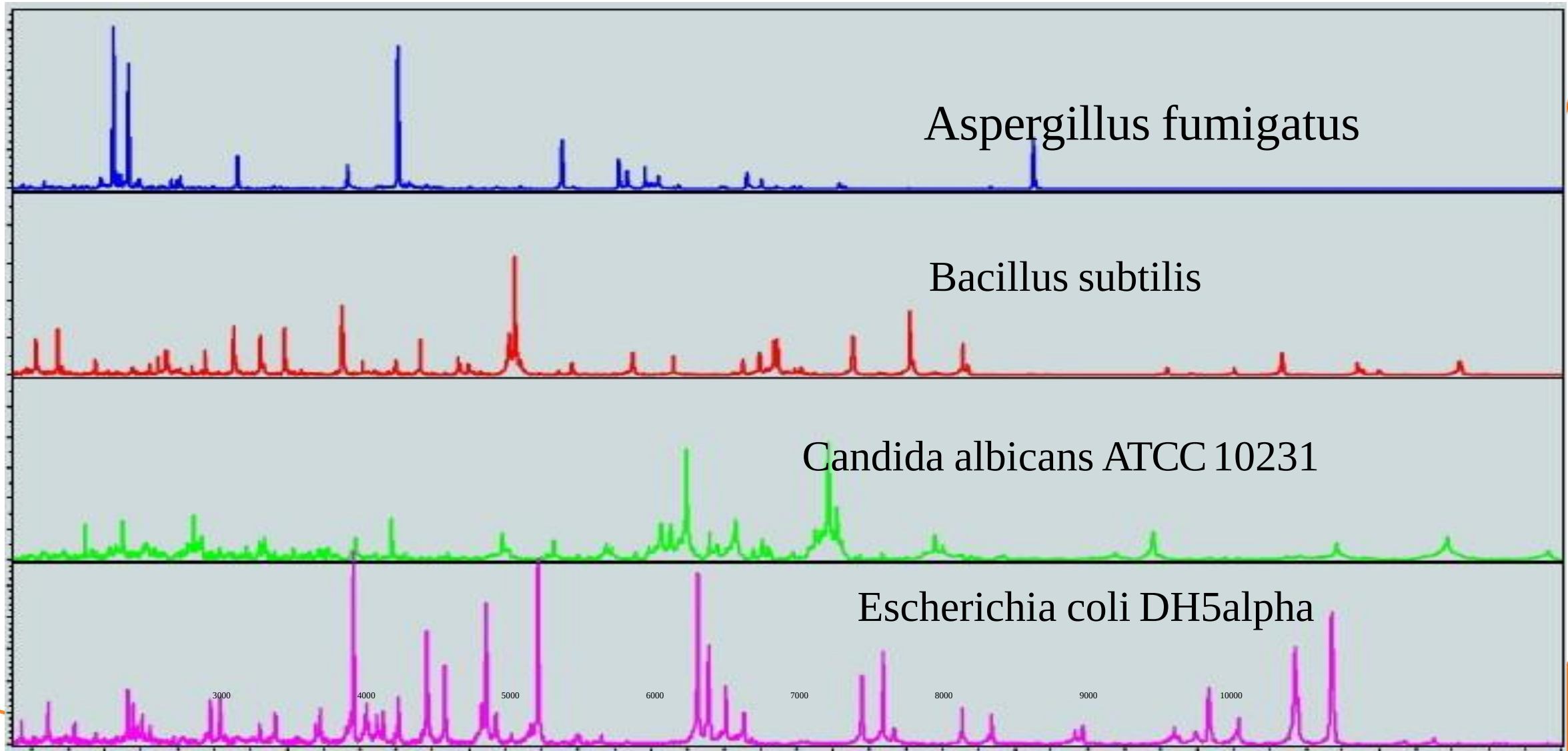
Масс-спектр *Escherichia coli*

Intens. [a.u.]



MALDI-TOF

Широкий спектр идентификации



Готовые библиотеки микроорганизмов (>6500) фрагмент базы

Acetobacter aceti subsp. aceti
Acetobacter pasteurianus subsp.lovaniensis
Acetobacter pasteurianus subsp.pasteurianus
Actinomadura aurantiaca
Actinomadura libanotica
Actinomadura livida
Agrobacterium tumefaciens
Arthrobacter globiformis
Arthrobacter oxydans
Arthrobacter pyridinolis
Arthrobacter sulfureus
Bacillus alcalophilus
Bacillus cohnii
Bacillus sphaericus
Brevibacillus brevis
Brevibacterium linens
Cellulomonas flavigena
Cellulomonas turbata
Corynebacterium glutamicum
Comamonas testosteronii
Gluconobacter oxydans subsp. oxydans
Gluconobacter oxydans subsp.oxydans
Gordonia amarae
Gordonia rubropertincta
Gordonia terrae
Halomonas denitrificans
Halomonas elongata
Halomonas elongata
Halomonas halmophila
Halomonas halmophila
Hydrogenophaga flava
Hydrogenophaga pseudoflava

Methylobacterium mesophilicum
Methylobacterium organophilum
Methylobacterium radiotolerans
Methylobacterium rhodesianum
Paracoccus versutus
Paracoccus versutus
Pseudomonas balearica
Pseudomonas fluorescens
Pseudomonas fluorescens
Pseudomonas oleovorans
Pseudomonas putida
Pseudomonas stutzeri
Pseudonocardia hydrocarbonoxydans
Rhizobium leguminosarum
Rhodococcus coprophilus
Rhodococcus fascians
Rhodococcus globerulus
Rhodococcus rhodnii
Rhodococcus rhodochrous
Rhodococcus ruber
Sinorhizobium meliloti
Starkaya novella
Starkaya novella
Streptomyces albus
Streptomyces avidinii
Streptomyces azureus
Streptomyces badius
Streptomyces griseus
Streptomyces hirsutus
Streptomyces lavendulae
Streptomyces phaeochromogenes
Streptomyces violaceoruber



Возможность
выявления известных
штаммов и новых
штаммов за 15 мин !

* База СЭС

* Библиотека грибов

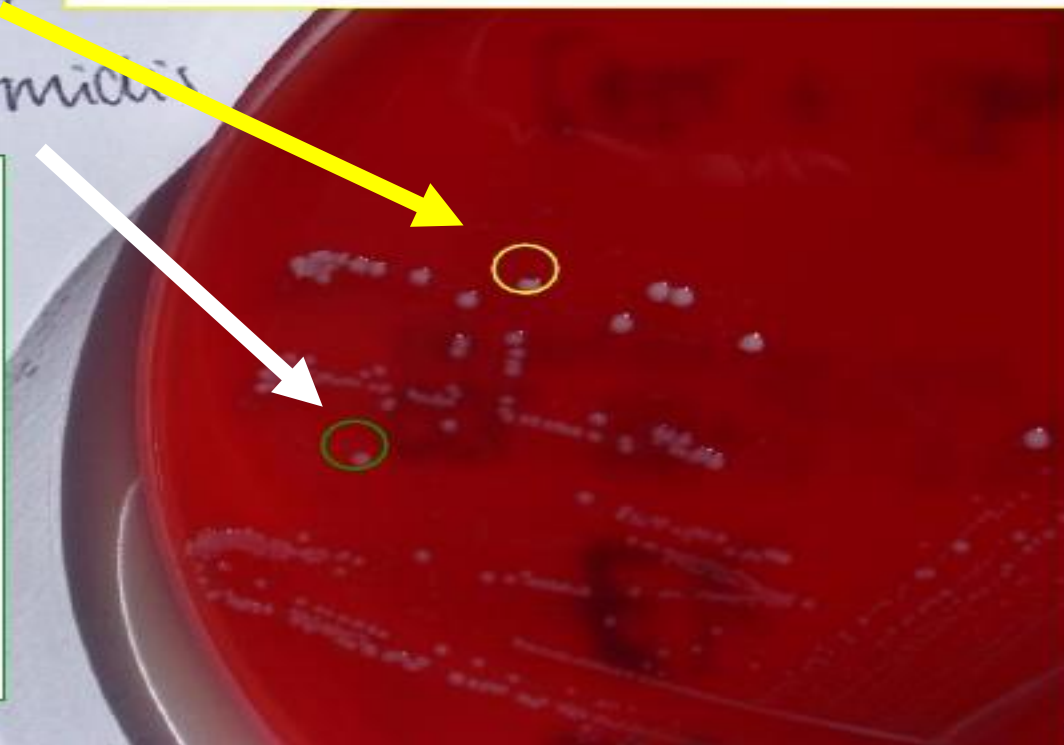
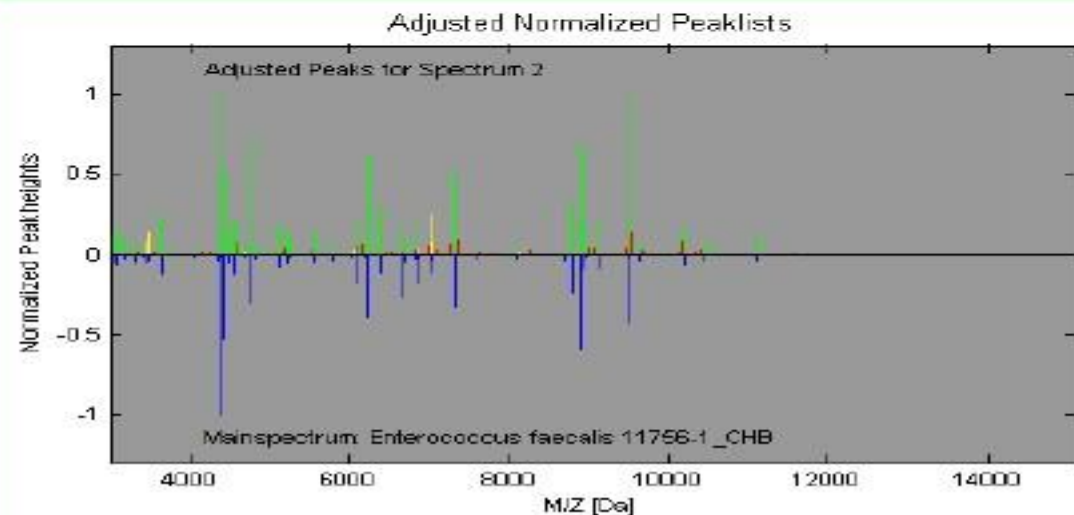
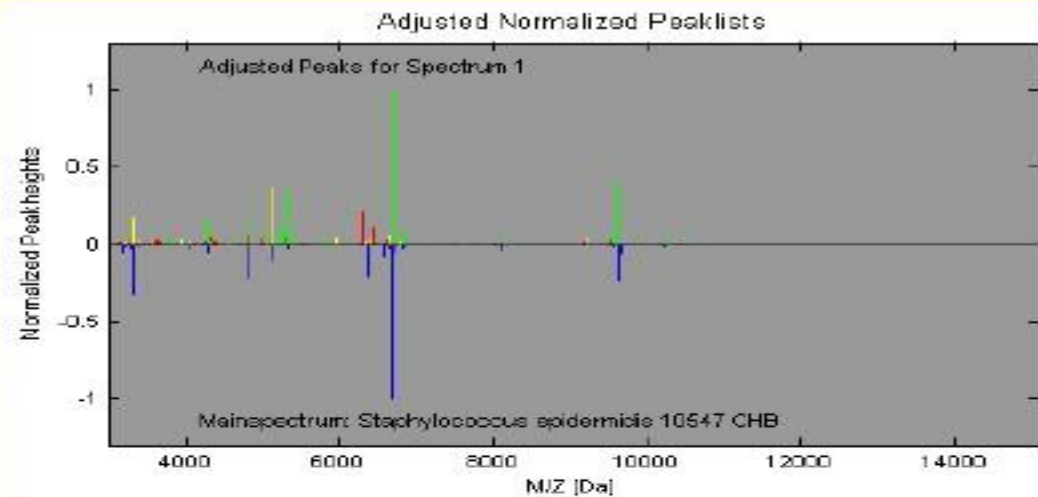
* Библиотека
микобактерий

* Ветеринарная
библиотека

«Тщательное» исследование *Enterococcus* с чашки

461-1

Enterococcus +
Staph. epidermidis



Пробоподготовка из различных типов клинического материала

Идентификация бактерий из мочи, жидкой культуры

- Центрифугирование образца
- Прямое нанесение осадка
- Или обработка осадка методом экстракции белков этанолом/муравьиной кислотой или трифторуксусной кислотой



Идентификация бактерий из положительной гемокультуры

- Прямое нанесение осадка после центрифугирования
- Применение набора MALDI Sepsityper
- Обеспечивает достоверный результат в положительных образцах гемокультур.
- При анализе инфекций крови, идентификация будет проведена на день раньше по сравнению с «классическими» методами.

Протокол MALDI Sepsityper

1. Отберите 1 мл гемокультуры в реакционную пробирку
2. Добавьте Lysis Buffer, перемешайте и отцентрифугируйте
3. Добавьте Washing Buffer перемешайте и отцентрифугируйте
4. Растворите осадок в воде
5. Проведите экстракцию белков по стандартному протоколу Bruker для идентификации микроорганизмов
6. Нанесите 1мкл экстракта на мишень и после высыхания покройте сверху HCCA-матрицей



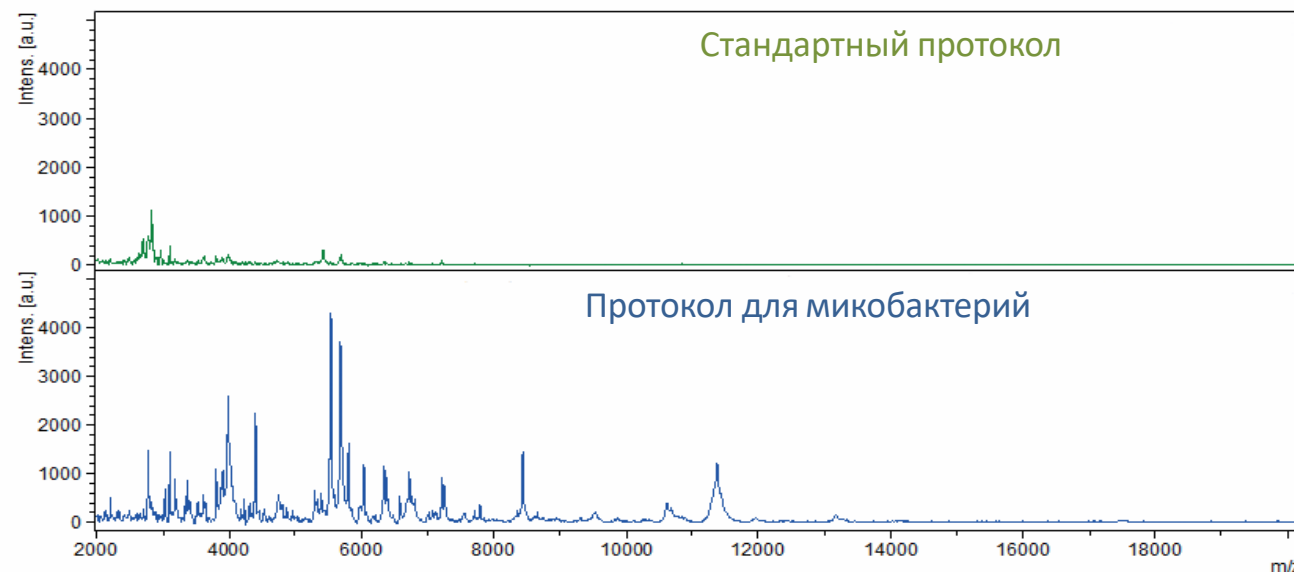
Biotyper: база микобактерий



- В марте 2012 года представлен оптимизированный метод пробоподготовки колоний микобактерий (инактивация + экстракция) путём использования силикатных шариков, что повышает уровень качества спектров и обеспечивает воспроизводимую идентификацию на уровне «до вида»
- Метод рассчитан на клинически-значимые штаммы *Mycobacterium tuberculosis* (МТК) и нетуберкулёзных микобактерии (НТМ)
- Эффективность идентификации микобактерий по системе Biotyper не изменяется при использовании различных сред культивирования (ВАСТЕС™ MGIT™ или Левенштейна-Йенсена)

Библиотека микобактерий

- Первая версия библиотеки микобактерий содержит более 90 видов микобактерий
- Библиотека создана при участии 17 лабораторий из 9 стран с целью максимально охвата данных по видам и подвидам микобактерий
- Пробоподготовка занимает 30 минут и незначительно влияет на стоимость анализа

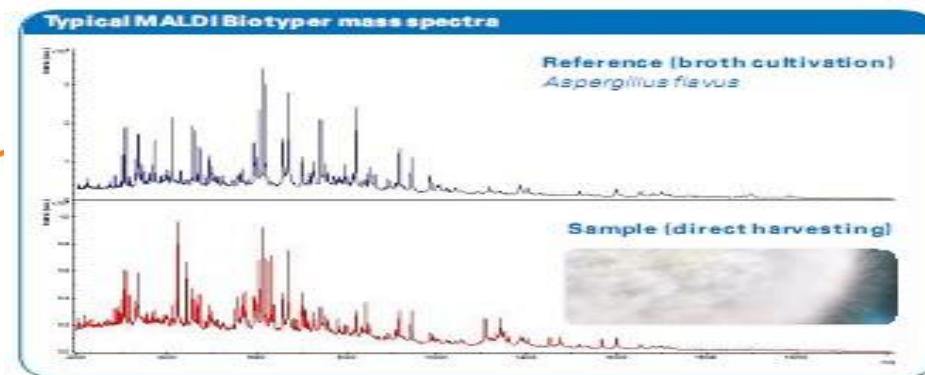
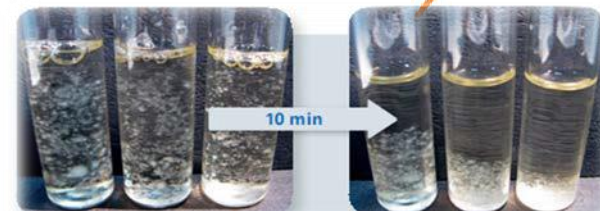
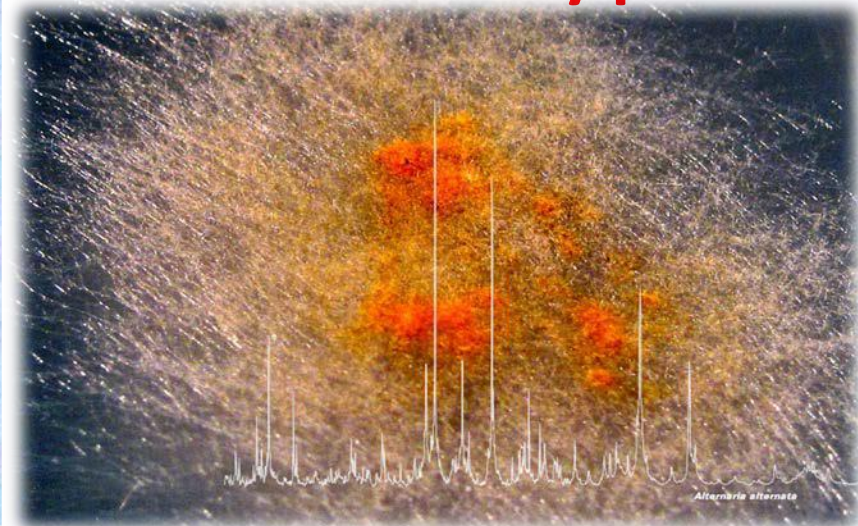


Biotyper: база мицелиальных грибов

- Идентификация дрожжевых и мицелиальных грибов сложная задача клинической микробиологии (требует высокой квалификации и опыта)
- В марте 2012 Bruker представил метод культивирования и адаптированную базу, что обеспечивает стабильную и уверенную идентификацию
- Протокол обеспечивает стабилизацию физиологического состояния грибов и препятствует образованию спор путём культивирования в жидкой среде

- Пробирки с жидкой средой засеваются образцами грибов, помещаются на шейкер и инкубируются одну ночь
- Далее проводят стандартную экстракцию этанолом/муравьиной кислотой
- В стандартном протоколе есть возможность прямого анализа с агара
- Если мицелий легко визуализируется, и может быть взят с плотной питательной среды, образец снимается с агара и обрабатывается этанолом/муравьиной кислотой без предварительного культивирования в жидкой среде

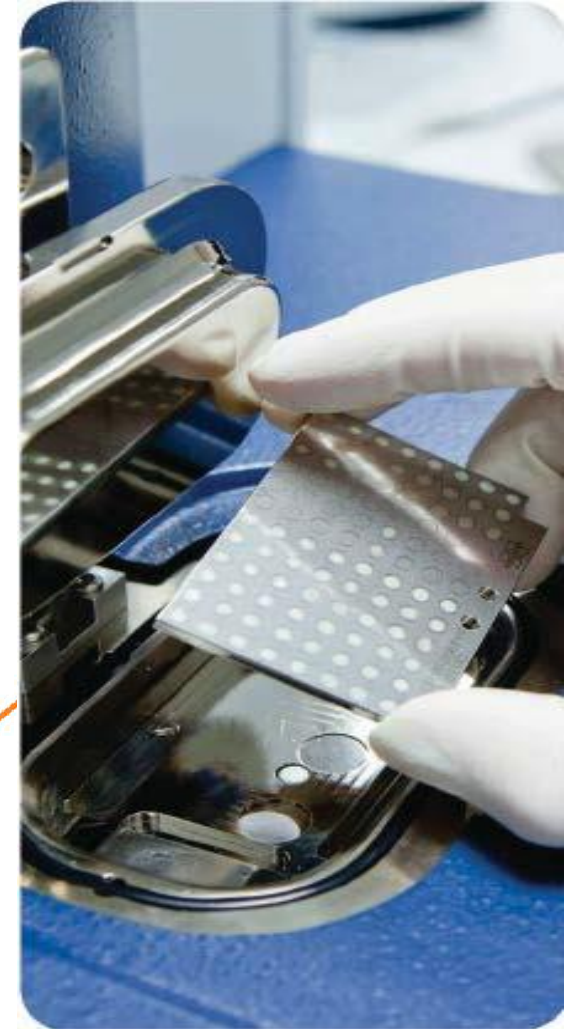
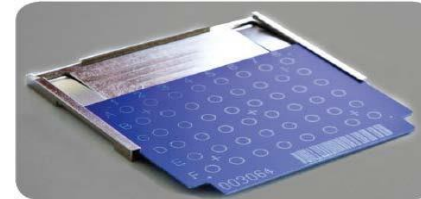
Библиотека мицелиальных грибов MALDI Biotyper (март 2012) содержит спектры более 100 видов, примерно 40 различных родов мицелиальных грибов



MALDI-Biotyper:

- Полностью открытая система
- Низкая стоимость идентификации (10-15 рублей)
- Минимальная пробоподготовка (несколько минут): полный процесс исследования 96 образцов занимает менее 1 часа
 - Нанесение образцов, высыхание -15 минут
 - Автоматический анализ – 20-30 минут

- Результаты идентификации на 25-30% точнее результатов бак. анализаторов
- Постоянное расширение базы данных
 - 2012: микобактерии и мицелиальные грибы
 - Возможность добавления в базу данных своих спектров
- Возможность прямого определения возбудителя в моче, гемокультуре, ликворе
- Идентификация смеси из двух микроорганизмов
- Интеграция в ЛИС
 - Поддержка бар-кодирования
 - Интеграция с бак. анализаторами (Walkaway, Vitek2)



Где уже есть Biotyper?

MALDI-Biotyper в ЛПУ России:

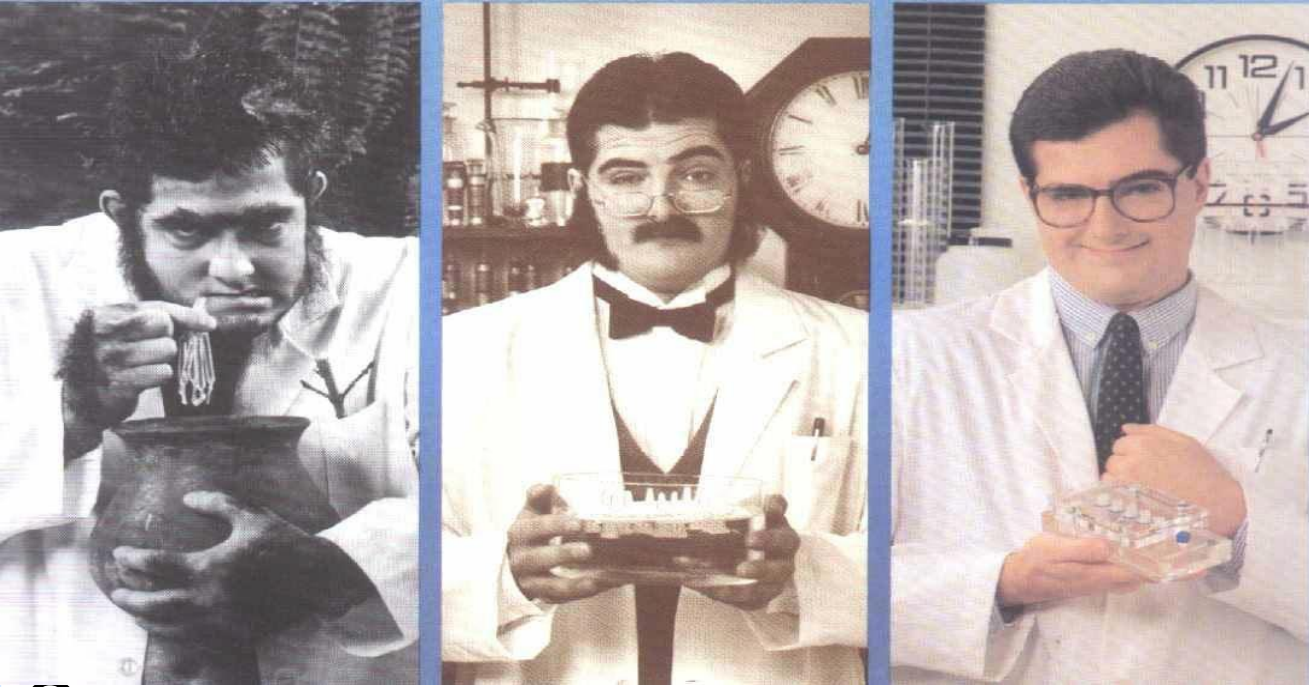
по состоянию на январь 2012

- ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва
- ФГУ НИИ физико-химической медицины, Москва
- Кожно-венерологический институт Минздрава РФ (ЦНИКВИ), Москва
- Научный центр здоровья детей РАМН (НЦЗД), Москва
- Детская городская поликлиника № 121, Москва
- «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова», Москва
- Федеральный научно-клинический центр Детской гематологии онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва, Москва
- Гематологический научный центр РАМН(ГНЦ), Москва
- Независимая лаборатория ИНВИТРО, Москва
- ООО "Волгоградский диагностический центр" (ВЦД), Волгоград
- Северо-Западный Центр доказательной медицины, Санкт-Петербург
- ФГУ «НИИ Детских Инфекций ФМБА», Санкт-Петербург
- ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург»
- ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора (ТНИИКИП), Тюмень.
- ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, Иркутск
- ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь
- ФГУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону,
- МУЗ Городская больница № 2 КМЛДО г. Краснодара.
- Краевая клиническая больница № 1 им. С.В.Очаповского, г. Краснодар
- Инфекционная больница № 2 г.Сочи
- ОГБУЗ «Костромская областная больница», Кострома
- НИИ антимикробной химиотерапии ГОУ ВПО СГМА (НИИАХ), Смоленск
- ММБУ Медико-Санитарная Часть № 2 (МСЧ № 2), г. Самара
- ГМУ «Республиканская клиническая больница» Республики Татарстан, г. Казань
- Красноярский государственный медицинский университет (КрасГМУ), Красноярск



Европа	358
США	45
Россия	40
Япония	11
Южная Корея	7
Китай	7
Австралия	6
Тайланд	4
Канада	3
Сингапур	3
Индия	3
Новая Зеландия	2
Ближний Восток	2
Южная Африка	2
Чили	1
Всего:	471

Применение **методов молекулярной диагностики** в клинической микробиологии оправдано в тех случаях, когда классические микробиологические методы оказываются несостоятельны или занимают слишком много времени



Основные тенденции развития современной микробиологии:

1. Стандартизация и автоматизация процесса исследования
2. Снижение удельного веса и централизация многоэтапных, трудоёмких методик
3. Объективизация внутреннего контроля качества
4. Сокращение времени анализа:
 - Совмещение этапов бактериологического исследования
 - Внедрение новых методик

Благодарю за внимание

Москва



АКАДЕМИЯ
ПОСТДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБУ ФНКЦ ФМБА РОССИИ

Кафедра Клинической лабораторной
диагностики и патологической
анатомии



Денисова



Ольга



Владимировна



Телефон +7-985-644-



80-90 (в том числе
вотсапп)



[email.com](mailto:denisova_ov@inbox.ru)
[denisova_ov@inbox.r](mailto:denisova_ov@inbox.ru)
u