

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Вятский государственный университет»
Биологический факультет
Кафедра микробиологии

Рекомендовано к использованию
в учебном процессе
протокол заседания кафедры
№ _____ от _____
Заведующий кафедрой,
доктор медицинских наук, профессор
_____ И.В. Дармов

И.В. Маракулин

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Учебное пособие

Киров 2012

СОДЕРЖАНИЕ

1. Тема №1 «Систематика микроорганизмов».....	3
2. Тема №2 «Современные принципы и методы изучения таксономии и идентификации микроорганизмов»	12
3. Тема №3 «Методы получения «накопительных» и «чистых» культур микроорганизмов. Этапы обычной и ускоренной идентификации микроорганизмов. Техника отбора проб для баканализа».....	20
4. Тема №4 «Использование биохимических тестов для идентификации микроорганизмов».....	28
5. Тема №5 «Безопасность работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности».....	35
6. Тема №6 «Идентификация микроорганизмов с использованием иммунохимических методов».....	42
7. Тема №7 «Использование молекулярно-генетических методов при видовой идентификации микроорганизмов».....	53
8. Тема №8 «Виды ПЦР-анализа, используемые для выявления и идентификации микроорганизмов. Основные принципы постановки ПЦР-анализа в «классическом» формате, «горячий старт», «Real time PCR».....	63
9. Тема №9 «Факторы патогенности микроорганизмов и методы их выявления».....	81

Тема №1

« Систематика микроорганизмов»

Вопросы:

- 1.1. Размеры микроорганизмов
- 1.2. Морфология клеток
- 1.3. Морфологическая дифференцировка
- 1.4. Покоящиеся формы
- 1.5. Положение микроорганизмов в системе живого мира
- 1.6. Классификация прокариотов.

1.1. Размеры микроорганизмов

Объекты, относимые к микроорганизмам, выделены по признаку их малых размеров и одноклеточных форм. Диапазон размеров микроорганизмов велик. Размеры одноклеточных зеленых водорослей и клеток дрожжей составляют десятки микрометров. Линейные размеры бактерий в среднем 0,5-3 мкм, нитчатые формы могут достигать в длину до 1мм .

Самые мелкие из известных прокариотных клеток – бактерии, принадлежащие к группе микоплазм – 0,1-0,15 мкм. Этот размер является теоретическим пределом клеточного уровня организации жизни, при котором в клетке еще может быть минимум молекул белка (порядка 1200) и минимум ферментных реакций, необходимых для поддержания клеточной структуры. Мельчайшие микоплазменные клетки равны или даже меньше частиц вирусов.

Бактериальные клетки обычно можно увидеть в световой микроскоп. Размеры большинства вирусов находятся в диапазоне 16-200 нм (10⁻⁹) и лежат за пределами его разрешающей способности. Впервые наблюдать вирусы и выяснить их структуру удалось после изобретения электронного микроскопа. По своим размерам вирусы занимают место между самыми мелкими бактериальными клетками и самыми крупными органическими молекулами.

1.2. Морфология клеток

Микроорганизмы по форме делятся на группы: сферические, цилиндрические, спиральные, необычной формы и нитчатые. Сферические

бактерии, или кокки, имеют округлую форму. В зависимости от расположения клеток после их деления подразделяются на группы.

Микрококки – делятся в одной плоскости, и после деления клетки располагаются одиночно. Диплококки – делятся в одной плоскости, и после деления их клетки располагаются попарно. Стрептококки – делятся в одной плоскости, после деления между клетками сохраняется связь, и они располагаются в виде цепочек. Тетракокки – делятся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, и после деления образуют тетрады. Сарцины делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях и после деления располагаются в виде пакетов из 8, 16, 32, 64 клеток. Стафилококки делятся в нескольких плоскостях, после деления клетки располагаются в виде виноградной грозди. Кокки не всегда бывают правильной круглой формы, они могут быть ланцетовидными, удлинёнными, чечевицеобразными, бобовидными и др.

Цилиндрическая форма характерна для большинства бактерий. Палочковидные формы бактерий различаются по длине, по поперечному диаметру, по форме концов клеток и характеру их расположения. Спиральной формы бактерии различаются количеством и характером завитков, длиной и толщиной клеток. Их подразделяют на негнущиеся (вибрионы, спириллы) и изгибающиеся (спирохеты) формы. Необычные формы бактерий морфологически разнообразны.

Тороидальные – замкнутые или незамкнутые кольца. Звездообразные клетки напоминают шестиугольную звезду. Тубероидальные клетки – это палочковидные бактерии со сферическими вздутиями. Форма плоских квадратных пластинок и коробчовидных плоских клеток геометрически разнообразной формы характерна архебактериям. Встречаются червеобразные клетки с заостренными тонкими концами и др.

Нитчатые формы бактерий – это палочковидные клетки, которые соединяются в длинные цепочки, объединяемые слизью, чехлами, плазмодесмами (мостиками) или общей оболочкой. Нити трихомных бактерий могут быть свободноплавающими или прикрепленными к субстрату.

Большинство бактерий одноклеточны, но имеются формы, состоящие из многих клеток. Примером истинно многоклеточных прокариотов с функциональной дифференциацией являются азотфиксирующие цианобактерии, у которых фиксация азота осуществляется гетероцистами – специализированными неделящимися клетками. Как правило, трихомные бактерии, стафилококки и др. образуют скопления клеток, не имеющих функциональной дифференциации – многоклеточные комплексы.

Все перечисленные формы бактерий характеризуются постоянством формы клетки. Однако имеются полиморфные бактерии. К ним относятся бактерии, которые лишены клеточной стенки; бактерии, у которых в цикле развития наблюдается смена форм клеток кокк-палочка-кокк; это могут быть и слабоветвящиеся формы. У ряда бактерий клетки могут образовывать различной формы выросты – простеки.

1.3. Морфологическая дифференцировка

Морфологическая дифференцировка вегетативных клеток связана с повышением выживаемости бактерий. Способность к формированию специализированных клеток, отличающихся от вегетативных клеток бактерий, запрограммирована в генетическом аппарате. Формирование таких структур происходит в процессе развития бактериальной клетки или под действием внешних факторов.

Большинство таких структур относится к категории покоящихся форм, назначение которых – обеспечить переживание вида в течение длительного времени в неблагоприятных условиях. После попадания в благоприятные условия покоящиеся формы прорастают, давая начало вегетативным клеткам.

Другие морфологически дифференцированные клетки служат для размножения. К ним относятся, например, гормогонии и бациллы цианобактерий. Наконец, третьи (гетероцисты цианобактерий, бактериоиды клубеньковых бактерий) связаны с фиксацией молекулярного азота атмосферы.

1.4. Покоящиеся формы

Эндоспоры – это особый тип покоящихся клеток грамположительных бактерий, формирующихся внутри цитоплазмы материнской клетки. В каждой бактериальной клетке формируется одна эндоспора. Эндоспоры обладают многослойными белковыми покровами, наружной и внутренней мембранами, кортексом. Кроме того, они устойчивы к высоким температурам и радиации, летальным в норме для вегетативных клеток.

Образование эндоспор – процесс, происходящий только в мире прокариотов. Этапы формирования эндоспоры на примере бактерий родов *Bacillus* и *Clostridium*:

1. У одного из полюсов клетки часть цитоплазмы вместе с генетическим материалом уплотняется и обособляется с помощью перегородки. Перегородка формируется впячиванием внутрь клетки ЦПМ. Эта стадия формирования споры напоминает клеточное деление.

2. Образование споры – «обрастание» отсеченного участка мембраной вегетативной клетки. Проспора расположена внутри материнской клетки и полностью отделена от нее двумя элементарными мембранами: наружной и внутренней. Описанные этапы формирования споры обратимы. Если к спорулирующей культуре добавить хлорамфеникол (ингибитор белкового синтеза), то можно остановить «обрастание» и процесс спорообразования превратится в процесс клеточного деления. После образования споры дальнейшие этапы спорообразования уже необратимы.

3. Формирование кортекса между наружным и внутренним мембранными слоями споры.

4. Синтез спорных покровов поверх наружной мембраны. Число, толщина и строение покровов различаются у разных видов бактерий. В формировании слоев спорных покровов принимает участие как наружная мембрана споры, так и протопласт материнской клетки.

5. Формирование многослойного экзоспориума поверх покровов спор. Все слои, окружающие протопласт эндоспоры, находятся внутри материнской клетки. На их долю приходится примерно половина сухого вещества споры. После формирования споры происходит разрушение (лизис) «материнской» клеточной стенки, и спора выходит в среду.

Отличия споры от вегетативной клетки:

1. Белки эндоспор богаты цистеином и гидрофобными аминокислотами, с чем связывают их устойчивость к действию неблагоприятных факторов.

2. Содержание ДНК и РНК в споре ниже, чем в исходной вегетативной клетке.

4. Накопление в спорах дипиколиновой кислоты и ионов кальция в эквимолярных количествах. Эти соединения образуют комплекс, локализованный в сердцевине споры. Обеспечивает термоустойчивость споры.

5. Повышенное содержание других катионов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^{+}), с которыми связывают пребывание спор в состоянии покоя и их термоустойчивость.

Покоящиеся клетки бактерий характеризуются низким уровнем метаболизма. В первую очередь дыхания. Для всех покоящихся форм характерна повышенная устойчивость к действию разнообразных повреждающих факторов: высоких и низких температур, обезвоживанию, высокой кислотности среды, радиации, механических воздействий и др. В наибольшей степени эта устойчивость проявляется у эндоспор. Для эндоспор

основными факторами, обеспечивающими их устойчивость, предположительно является дегидратация (обезвоженность цитоплазмы), термостойкость спорных ферментов, а также наличие дипиколиновой кислоты и большого количества двухвалентных катионов. Большой вклад в устойчивость спор вносят поверхностные структуры. Условия, способствующие образованию покоящихся клеток: наличие или отсутствие определенных питательных веществ в питательной среде (метаболитов), изменение температуры, кислотности среды, условий аэрирования. Помимо факторов внешней среды, обнаружены специфические вещества – индукторы спорообразования. Такие вещества могут выделяться в культуральную среду или накапливаться внутри клетки.

Сформированные покоящиеся клетки могут долгое время находиться в жизнеспособном состоянии и прорасти в подходящих условиях. Процесс прорастания состоит из нескольких этапов: активации, инициации и выростания.

Экзоспоры – в отличие от эндоспор формируются снаружи. У большинства актиномицетов споры формируются путем деления гифы перегородками на участки, каждый из которых представляет собой будущую спору. Образование экзоспор сопровождается уплотнением и утолщением клеточной стенки. У экзоспор отсутствуют дипиколиновая кислота и характерные для эндоспор структуры (кортекс, экзоспориум). У актиномицетов споры являются покоящимися клетками и одновременно репродуктивными структурами. Экзоспоры бактерий из рода *Methylosinus* и *Rhodomicrobium* формируются в результате отпочкования от одного из полюсов материнской клетки.

Цисты встречаются у разных групп бактерий. Могут морфологически не отличаться от вегетативных клеток. У азотобактера образование цист сопровождается изменением морфологии клетки, потерей жгутиков и накоплением в цитоплазме поли- β -оксимасляной кислоты; одновременно происходит синтез дополнительных клеточных покровов: внешних (экзина) и внутренних (интина), различающихся структурно и химическим составом.

Акинеты – покоящиеся клетки некоторых цианобактерий. Они крупнее вегетативных клеток, имеют продолговатую или сферическую форму, гранулированное содержимое и толстую оболочку. Прорастание акинет происходит иногда вскоре после их образования или только после перенесения в свежую питательную среду.

Цисты и акинеты более устойчивы к нагреванию, высушиванию, различным физическим воздействиям, чем вегетативные клетки. Гетероцисты и бактериоиды участвуют в фиксации атмосферного азота.

Гормогонии, бaeоциты – образуются у цианобактерий и служат для размножения.

1.5. Положение микроорганизмов в системе живого мира

Начиная с Аристотеля, биологи делили живой мир на два царства: растений и животных. Во второй половине XIX в. немецкий биолог Э. Геккель (E. Haeckel, 1834-1919гг.) предложил выделить все микроорганизмы, у которых отсутствует дифференцировка на органы и ткани (простейшие, водоросли, грибы, бактерии), в отдельное царство *Protista*.

Данные о различии в строении клеток микроорганизмов, входящих в группу *Protista*, начали накапливаться с конца XIXв, что повлекло за собой деление группы на высшие и низшие протисты в соответствии с двумя типами клеточной организации – эукариотной и прокариотной. Р. Меррей (R. Murray) в 1968 г. предложил все клеточные организмы разделить на два царства: *Prokaryotae* и *Eukaryotae*.

Р. Уиттэкер (R. Whittaker) предложил схему, по которой все живые организмы, имеющие клеточное строение, представлены разделенными на пять царств. Такая классификация отражает три основных уровня клеточной организации: *Monera* включает прокариотные организмы, *Protista* – микроскопические эукариоты, многоклеточные эукариоты представлены в свою очередь тремя царствами *Plantae*, *Fungi* и *Animalia*. Три последние таксономические группы различаются по способу питания: фототрофный тип питания характерен для растений (*Plantae*); грибы (*Fungi*) в основном питаются осмотрофно; животные (*Animalia*) осуществляют голозойное питание.

1.6. Классификация прокариотов

Одна из задач систематики прокариот, как и других живых существ, распределение множества организмов по группам. Для характеристики организмов используют разнообразные признаки: морфологические, цитологические, культуральные, физиологические, биохимические, иммунологические, генетические и др.

В систематике бактерий для наименования объекта используют бинарную номенклатуру К. Линнея. Названия бактериям присваивают в соответствии с правилами «Международного кодекса номенклатуры бактерий» разработанного в 1948 г. комиссией по номенклатуре и таксономии бактерий. От Ботанического кодекса он отличается тем, что типом вида в нем служит штамм.

Биологическая концепция вида разработана зоологами. Трудность ее применения в микробиологии связана с тем, что прокариоты и многие эукариотические микроорганизмы не обладают полом и критерий репродуктивной изоляции к ним неприменим.

Понятие микробиологического вида в настоящее время не удается согласовать с биологической концепцией вида, микробиологи используют его таксономическое определение. Вид бактерий может быть определен как совокупность штаммов с высоким уровнем последовательностей ДНК, а также фенотипических признаков. Различия между штаммами не выходят за пределы вида. Клон – еще более узкое понятие, это культура, выделенная из одной клетки.

Исходная дата для названия таксонов МКНБ принимается 1 января 1980 г. Названия, признанные правильными, были включены в «Одобренные списки названий бактерий», не включенные в них названия потеряли свое положение в номенклатуре.

Существуют 2 типа систематики биологических объектов:

1. Филогенетическая в основе которой лежит установление родственных (генетических, эволюционных) связей между организмами.

2. Практическая, или искусственная, цель которой – выявление степени сходства между организмами для быстрой их идентификации и установления принадлежности к определенным таксонам.

Если существующая систематика высших организмов отражает эволюционные связи между ними, то попытка создания на этой же основе систематики прокариот не была успешной. В XX в. проблема систематики бактерий стала настоящей в связи со стремительным увеличением объема знаний об этих организмах.

Вначале основное внимание уделяли морфологическим признакам бактерий. О. Ф. Мюллер (1730-1784гг.) в 1773 г. разделил известные к тому времени 15 видов бактерий на два рода – *Monas* и *Vibrio*. В 1872 г. Ф.-Ю. Кон (1828-1898гг.) разделил бактерии на группы по морфологическим признакам: кокки, короткие палочки, удлинённые палочки, спирали. В 1909 г. С. Орла-Йенсен (1870-1949гг.) сделал попытку классифицировать бактерии на основе известных к тому времени физиологических признаков.

Важным шагом в развитии систематики прокариот явилось использование признаков, дающих информацию о химическом строении клетки: состав оснований ДНК, аминокислотная последовательность белков, строение рибосом, компонентов клеточной стенки и т. д.

Первые предложенные схемы классификации бактерий были крайне субъективны. В 1957г. П. Снитом был предложен нумерический метод

Адансона (M. Adanson, 1727-1806гг.). Классификация, построенная на принципах Адансона, - трудоемкий процесс, поэтому свое развитие и практическое применение она получила в связи с развитием вычислительной техники.

Нумерическая таксономия может быть полезна при оценке степени сходства между таксонами невысокого ранга (виды, роды), но прямого отношения к созданию филогенетической системы прокариот не имеет. Наиболее полно задача быстрой идентификации бактерий решается с помощью Определителя бактерий Берджи, выпускаемого Обществом американских бактериологов. Первое издание определителя было выпущено в 1923 г. группой американских бактериологов под руководством Д. Х. Берджи (D. H. Bergey, 1860-1937); девятое издание в 4 томах вышло в 1984-1989 гг. десятое – издано в 2001-2009 гг.

В десятом издании Определителя бактерий Берджи все обнаруженные организмы, отнесенные в царство *Prokaryotae*, разделены на 35 групп. Признаки, по которым осуществляется разделение на группы, относятся к категории легко определяемых и вынесены в названия групп. Представленная в Определителе бактерий Берджи система классификации является строго идентификационной и не решает задачи выявления эволюционных связей между прокариотами.

Важный шаг на пути создания естественной систематики прокариот связан с успехами молекулярной биологии. Оказалось, что бактерии могут быть классифицированы путем сравнения их геномов. Карл Вёзе (1977г.) разработал наилучшую до этого времени концепцию филогенетического древа не только для бактерий, но и для эукариотов. В качестве филогенетического маркера он использовал последовательность оснований олигонуклеотидов рРНК 16S (у прокариот) и 18S (у эукариот). Эти маркеры наиболее соответствуют необходимым требованиям: универсальности, гомологичности (изофункциональности) и генетической стабильности.

Рибосомы обнаружены у всех клеточных форм жизни, что указывает на их древнейшее происхождение; их функции всегда одинаковы; первичная структура характеризуется высокой консервативностью.

К настоящему времени последовательности 16S и 18S рРНК изучены у многих организмов, принадлежащих к разным царствам живой природы. На основании полученных данных были рассчитаны коэффициенты сходства и выявлены три группы организмов: эукариоты, эубактерии (сюда же попали 16S рРНК митохондрий и хлоропластов) и архебактерии. Хотя клетки архебактерий структурно относятся к прокариотному типу, они построены из макромолекул, многие из которых являются уникальными и не

синтезируются ни эукариотами, ни эубактериями. Архебактерии осуществляют ряд биохимических процессов, не свойственных остальным живым организмам и существуют в экстремальных условиях. На основании этого был сделан вывод, что архебактерии представляют собой самостоятельный таксон. В то же время анализ генов показал, что *Eucaryotae* и *Archaeobacteria* имеют общее происхождение и таким образом являются сестринскими таксонами, тогда как *Eubacteria* представляет собой отдельную эволюционную линию, которая ответвилась раньше от общего корня.

Тема №2

«Современные принципы и методы изучения таксономии и идентификации микроорганизмов»

Вопросы:

1. Факторы, влияющие на совершенствование методических приёмов таксономии и идентификации микроорганизмов.
2. Современные методические приёмы, используемые при идентификации микроорганизмов.

1. Факторы, влияющие на совершенствование методических приёмов таксономии и идентификации микроорганизмов.

Современный период развития медицинской микробиологии характеризуется расширением перечня заболеваний, при которых микроорганизмы выступают в качестве основного этиологического фактора или принимают непосредственное участие в патогенезе процесса. Имеются многочисленные данные об участии различных микроорганизмов в развитии атеросклероза, заболеваний желчевыводящих путей, некоторых форм гипертонической болезни и сахарного диабета, злокачественных новообразований и некоторых других соматических заболеваний.

Резко увеличилось число заболеваний смешанной этиологии, что часто затрудняет решение вопроса, какой из выделенных микроорганизмов является ведущим этиологическим фактором, а, следовательно, допускаются ошибки при выборе антибиотиков для лечения таких инфекций.

Сложность проведения микробиологического анализа усугубляется возросшими темпами внутривидовой изменчивости микроорганизмов, что сопровождается возникновением и циркуляцией в природе большого числа атипичных штаммов. Выраженная изменчивость микроорганизмов, обусловленная лёгкостью возникновения у них мутаций, и высокая скорость размножения позволяют микроорганизмам в течении короткого времени закреплять новые признаки.

Всё выше сказанное предъявляет особые требования к современной клинической микробиологии и прежде всего это касается качества микробиологических исследований и экспрессности их проведения. Время выдачи результатов анализов от момента получения биопробы до выдачи достоверных результатов нередко ограничивается часами независимо от видовой принадлежности микробного агента. Определение таксономической принадлежности микроорганизма или идентификация бактериальной

субстанции, ответственной за тот или иной биологический эффект, даже без выделения чистой культуры в течении нескольких часов в настоящее время уже реальность.

Всё вышеизложенное диктует необходимость разработки и внедрения в микробиологическую практику новых принципов и методических подходов к изучению таксономии и идентификации микроорганизмов. Современные достижения в области микробиологии, биотехнологии, вычислительной техники, аналитических приборов позволяют в короткое время исследовать множество характеристик значительного количества микробных культур, проводить быстрое сопоставление свежевыделенных изолятов с коллекционными штаммами. Всё возрастающее многообразие микроорганизмов, имеющих клиническую значимость, привело к тому, что на нынешнем этапе развития микробиологии задачи, связанные с изучением таксономии и идентификации микроорганизмов, в значительной степени совпадают и различия между микробиологами общего профиля и узкими специалистами в области прикладной микробиологии становятся всё более несущественными.

2. Современные методические приёмы, используемые при идентификации микроорганизмов

Можно выделить несколько основных направлений, по которым развивается современная микробиологическая диагностика. Это в первую очередь модификация традиционных микробиологических методов и внедрение в практику новых селективных и дифференциально-диагностических питательных сред, иммунных препаратов и лабораторного оборудования. Широкое распространение находят промышленно изготовленные стандартные наборы, содержащие разнообразные биологические реагенты и питательные среды, микробиологическое оборудование одноразового использования (пластиковые чашки Петри, пипетки, контейнеры для сбора и транспортировки биологического материала, бактериологические петли и др.), не требующие дополнительного времени и персонала при проведении подготовительных процедур.

Изучение физиолого-биохимических свойств до настоящего времени наиболее распространённый метод установления таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов, основанная на изучении этих характеристик, в последние годы получила новые перспективы в связи с разработкой и внедрением в практику миниатюрных экспресс-тестов определения ферментативной активности широко используются для

идентификации энтеробактерий, неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов, вибрионов, стафилококков, стрептококков, нейссерий, анаэробных бактерий, грибов и других микроорганизмов. При этом точность идентификации достигается у более, чем 90% штаммов. Разработаны специальные устройства, позволяющие автоматизировать все операции постановки биохимических тестов, начиная от инокуляции соответствующих индикаторных полосок или ячеек и кончая обработкой и выдачей окончательных результатов. Подобные системы наряду с идентификацией позволяют проводить также ускоренное определение минимальных ингибирующих концентраций антибиотиков, что позволяет определить спектр лекарственной устойчивости.

С середины прошлого века для изучения тонкой структуры бактерий и уточнения классификационных схем, а в последние годы и для идентификации прокариотов и вирусов стали использовать разнообразные физико-химические и молекулярно-генетические методы. Их ценность обусловлена возможностью расширить число изучаемых характеристик и более объективно подходить к их анализу. Выигрышным моментом использования вышеуказанных методических подходов в таксономических целях и для идентификации микроорганизмов является также высокая скорость осуществления анализа, возможность определения нано- и субнанограмм веществ, выявления различия по тем признакам, которые другими методами анализировать невозможно. Всё большую популярность приобретают для целей идентификации такие физико-химические методы, как хроматография, электрофорез, термический анализ и их различные модификации и сочетания друг с другом и с другими физическими методами (ультрафиолетовая и инфракрасная спектроскопия, масс-спектрометрия, люминесцентный анализ и др.).

С помощью разнообразных приёмов хроматографии идентификацию микроорганизмов проводят, основываясь на определении продуктов метаболизма микроорганизмов, состава жирных кислот, полисахаридов микробной клетки, на анализе разнообразных аминов, продуцируемых в культуральную жидкость, и других компонентов, как связанных с клеткой, так и выделяющихся в окружающую среду.

Анализ летучих и нелетучих продуктов метаболизма (спиртов, органических кислот) методами газовой, газожидкостной, жидкостной или тонкослойной хроматографии нашёл широкое применение при идентификации анаэробных, микроаэрофильных бактерий, псевдомонад, энтеробактерий, бацилл и других микроорганизмов. Определение конечных продуктов метаболизма позволяет идентифицировать микроорганизмы и без

выделения их в чистой культуре. Идентификация и дифференциация микроорганизмов путём определения качественного и количественного состава жирных кислот микробной клетки с помощью хроматографии основывается на том, что внутри штаммов или видов бактерий имеет место продукция схожих метаболических продуктов и одинаков профиль жирнокислотного состава.

У некоторых микроорганизмов липидный состав столь уникален, что выявление определённых компонентов микробной клетки бывает достаточным для установления таксономической принадлежности исследуемой культуры. Анализ сложных липидов, экстрагированных из бактерий, с помощью разнообразных приёмов хроматографии и масс-спектрометрии позволяет с высокой точностью проводить родовую и видовую идентификацию фузобактерий, коринебактерий, микобактерий и других микроорганизмов. У бактерий обнаружено более 50 различных жирных кислот в количестве от следовых до 50-60% сухого вещества. Их определение с помощью газовой хроматографии позволяет, например, дифференцировать энтеробактерии в течение 6-8 часов. Для идентификации и дифференциации нейссерий, легионелл, бруцелл, трепонем, анаэробных и аэробных грамположительных и грамотрицательных бактерий всё большее распространение приобретает изучение с помощью газожидкостной и капиллярной хроматографии микробных липополисахаридов. Исследование большого числа родов и видов бактерий на способность продуцировать в культуральную жидкость разнообразные амины с использованием хроматомасс-спектрометрии продемонстрировало возможность применение этого приёма для хемосистематики и идентификации энтеробактерий и клостридий. Пиролизная хроматография позволяет определять продукты гидролиза высокомолекулярных компонентов микробной клетки (белков, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот, порфиринов и др.), образующиеся под действием высоких температур в течение 30 минут при этом для исследования достаточно одной колонии. Пиролизная газовая или газожидкостная хроматография и пиролизная масс-спектрометрия оказались полезными при классификации и идентификации энтеробактерий, псевдомонад, бацилл, микобактерий, грибов и других микроорганизмов. Таксономические возможности термического анализа увеличиваются при использовании приёма масс-фрагментографии. Используя автоматические интеграторы для анализа пирогамм, удаётся применять комплексный термический анализ как для научных целей, так и в рутинной практике при идентификации микроорганизмов.

Исследование бактериальных белков, пептидов и нуклеиновых кислот с помощью электрофореза в полиакриламидном геле для изучения таксономии и идентификации микроорганизмов широко используются в практической микробиологии. Современные методы электрофореза в полиакриламидном геле позволяют, например, провести разделение до 1000 бактериальных полипептидов в одном геле. При этом получают характерные для каждого белка пептидные карты. Сравнение денситограмм белков, как связанных с клеточной стенкой, так и присутствующих в культуральной жидкости, позволяет разделить бактерии на группы и установить сходство или различие между ними. Так, анализ состава растворимых белков различных нейссерий методом двухмерного электрофореза высокого разрешения позволил выявить для каждого микроорганизма на электрофореграммах более 200 индивидуальных полипептидов с характерным их расположением. Будучи высокочувствительным (даёт возможность обнаруживать штаммовые различия), метод электрофореза растворимых белков весьма перспективен при классификации микроорганизмов. Для анализа большого количества фракций белков используется микрометод на основе лазерной денситометрии.

Среди методических приёмов, широко используемых при изучении таксономии и идентификации микроорганизмов, необходимо указать большую группу иммунохимических методов, направленных на изучение бактериальных структур, обладающих антигенными свойствами. В иммунохимических реакциях при исследовании микробных антигенов в качестве связывающего агента используются антитела в сочетании с разнообразными метками и без них. В качестве меток применяют флуоресцентные вещества, ферменты, радиоактивные изотопы, бактериофаги и другие субстраты. Наиболее широко для указанной выше цели используются методы иммунофлуоресценции, радиоиммунологический, иммуноферментный, иммуноэлектрофорез, реакция коаггутинации, латексагглютинация и некоторые другие. Изучение антигенных характеристик микроорганизмов с помощью этих методов позволяет дифференцировать их на уровне родов и видов, а также является полезным маркером для инфраструктурного сравнения микроорганизмов. Новые перспективы для этих методов открылись с внедрением в качестве диагностических реагентов моноклональных антител. Появилась возможность тонкого анализа микробных макромолекул, обладающих антигенными свойствами, возникла возможность картирования антигенных детерминант и исследования химической природы антигенов.

Своеобразным методом изучения поверхностных структур микроорганизмов с целью их дифференциации и идентификации является тест агглютинации с лектинами (гликопротеиды и белки растительного, животного и микробного происхождения), способными агглютинировать клетки и (или) преципитировать гликоконъюгаты благодаря наличию у них свойств обратимо и избирательно связываться с углеводами, не вызывая их химического превращения. С помощью лектинов удаётся дифференцировать коагулазоположительные и коагулазоотрицательные стафилококки, бациллы и их отдельные серовары, разные виды бруцелл и другие патогенные виды бактерий.

Объективность информации, получаемой с помощью физико-химических и иммунохимических методов, в значительной степени определяется условиями культивирования микроорганизмов. Поэтому для стандартизации этих условий рекомендуется использовать, где это возможно, синтетические среды с известным составом и синхронизированные культуры.

Для сравнения большого количества штаммов микроорганизмов по значительному количеству признаков разработаны специальные эффективные компьютерные программы, позволяющие выделять штаммы, имеющие наибольшую степень родства. Метод нумерической таксономии успешно использовался для классификации псевдомонад, коринобактерий, энтеробактерий, стрептококков, легионелл и других микроорганизмов.

Определение нуклеотидного состава ДНК бактерий достаточно часто используется в таксономических исследованиях. Состав ДНК (процент гуанина + цитозина) в настоящее время определён более чем у 1000 видов бактерий. Различия в нуклеотидном составе ДНК свидетельствуют о неродственности сравниваемых микроорганизмов, хотя и сходство не всегда является основанием отнесения микробов к одному виду. Описан метод изучения нуклеотидного состава с помощью специально подобранных флуоресцентных красителей, позволяющих быстро определять состав ДНК на интактных клетках без выделения очищенных препаратов ДНК.

Серьёзным аргументом в пользу таксономической близости исследуемых микроорганизмов являются данные по молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот. Метод получения молекулярных гибридов ДНК находит всё большее применение не только при классификации микроорганизмов, но и для диагностических и эпидемиологических целей. В качестве примера можно привести данные исследований, в которых после выделения ДНК гена, детерминирующего продукцию энтеротоксина, использовали эту технику ДНК-ДНК гибридизации для обнаружения энтеропатогенных кишечных палочек. В

опытах ДНК-ДНК гибридизации широко используются бактериальные плазмиды. С помощью гибридизации плазмидных и хромосомных ДНК определяют присутствие уникальных последовательностей нуклеотидных оснований, характерных только для определённого вида или рода микроорганизмов. Метод молекулярной организации ДНК позволил провести переоценку таксономических позиций актиномицетов, псевдомонад, микобактерий, актиномицетов, энтерококков и других микроорганизмов. Современная техника гибридизации нуклеиновых кислот с использованием молекулярных зондов позволяет достигать высокой производительности в микробиологических исследованиях, что даёт возможность рассматривать этот метод как альтернативный инструмент в микробиологической диагностике.

Заметное место в таксономических исследованиях занимает тест гибридизации ДНК с рибосомальной РНК, где на гомологию исследуются небольшие фрагменты генетического материала.

Перспективным подходом к изучению таксономии микроорганизмов является сравнение баз данных олигонуклеотидных 5S и 16S рибосомальных РНК. Ценной особенностью данного метода является возможность сопоставлять более высокие, чем вид, таксономические категории. Например, анализ последовательностей олигонуклеотидов рибосомальных РНК прокариотических микроорганизмов позволил описать новое царство прокариотов-архебактерий.

Родство микроорганизмов можно также устанавливать на основании изучения локализации генов в группах сцепления в хромосомах этих организмов. Схожий характер сцепления является дополнительным аргументом в пользу близости сравниваемых бактерий. Дополнение этого метода рестрикционным анализом повышает возможность выявления сходства микроорганизмов. Анализ фрагментов хромосомной ДНК, получаемых при воздействии определённых рестриктаз, используется для идентификации неизвестных культур бактерий.

Большинство современных методов молекулярно-генетических исследований микроорганизмов используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Основанная на прямом выявлении нуклеотидных последовательностей микроорганизмов, не требующая выделения чистой микробной культуры, позволяющая выявлять нежизнеспособные и мёртвые, а также фенотипически изменённые микроорганизмы, ПЦР является перспективным методом, который может эффективно использоваться практически во всех микробиологических лабораториях. Более подробно об

использовании метода ПЦР для идентификации микроорганизмов будет изложено в последующих лекциях.

Таким образом, в последние годы для изучения таксономии и идентификации микроорганизмов наряду с традиционными всё более широко используются физико-химические, иммунохимические и молекулярно-генетические методы. Их внедрение в микробиологическую практику даёт огромные преимущества как в деле улучшения клинической микробиологии, так и для решения биотехнологических задач, связанных с использованием микроорганизмов.

Тема №3

«Методы получения «накопительных» и «чистых» культур микроорганизмов. Этапы обычной и ускоренной идентификации микроорганизмов. Техника отбора проб для баканализа»

Вопросы:

1. Техника отбора проб для баканализа.
2. Получение «накопительных» и «чистых» культур микроорганизмов.

1. Техника отбора и транспортирования проб для баканализа

Успех бактериологического исследования в значительной степени зависит от правильности взятия и транспортировки проб, содержащих биологические материалы. Очень часто несоблюдение правил взятия проб и условий и сроков их доставки в микробиологическую лабораторию являются причиной низкой высеваемости искомым микроорганизмов.

В зависимости от целей и задач микробиологических исследований пробы могут забираться из объектов окружающей среды, из продуктов питания, фуража, от больных людей и животных, растений и т.д.

Объектами окружающей среды, из которых могут забираться пробы, являются водоёмы, почва, воздух, растительность, поверхности зданий и сооружений, техники и др. для отбора проб из объектов окружающей среды можно использовать подручные материалы: стеклянные или пластиковые ёмкости, ватные или марлевые тампоны, намотанные на лучинки или палочки, пинцет, ножницы, лезвие бритвы или острый нож и др. основным условием является чистота используемых предметов. Если имеется возможность, то все используемые для взятия проб предметы надо тщательно вымыть или даже продезинфицировать с помощью спиртосодержащих жидкостей. Однако после дезинфекции предметы надо тщательно промыть и высушить, чтобы не осталось следов дезинфектанта.

В настоящее время промышленностью выпускаются специальные мобильные укладки для отбора проб биологических материалов. В состав этих упаковок входят необходимые приспособления для забора проб воды, грунта, воздуха, смывов с поверхностей и с растительности, для отлова насекомых, а также различные ёмкости и полиэтиленовые пакеты для транспортировки проб от места взятия до лаборатории. имеются даже специальные бланки для описания взятых проб. В бланке указывается вид пробы, её объём, время и место взятия, ФИО оператора, взявшего пробы и вид предполагаемого микроорганизма-контаминанта данной пробы.

Порядок отбора проб воды

Из открытых водоёмов пробы воды отбирают с глубины 10-15см от поверхности и на расстоянии 10-15 см от дна. Из водопровода воду берут в

стерильные флаконы с притёртой пробкой объёмом $0,5\text{дм}^3$, а из глубины водоёма-привязанным к шесту батометром или стеклянным сосудом с притёртой пробкой, к которой прикреплён шнур.

Водопроводную воду наливают после предварительного обжигания крана и стекания первых порций воды из него в течение 10-15мин.

Воду из колодца следует брать до начала пользования им или через 10-12ч после прекращения пользования им. Хлорированную воду перед исследованием нейтрализуют серноватистокислым натрием из расчёта 10мл на 1л воды. Промежуток времени с момента взятия пробы до бактериологического исследования не должно превышать 2ч (при температуре $1-5^{\circ}\text{C}$ можно хранить до 6ч).

Микробиологическое исследование почвы проводят в разных целях: агробиологи исследуют почву для выявления количества нитрифицирующих бактерий, азотфиксирующих бактерий, играющих большую роль в плодородии. Медико-ветеринарную службу интересуют патогенные микроорганизмы, попадающие в почву с трупами животных, с выделениями больных животных, с необеззараженными сточными водами. Бактериологический анализ почвы проводят при выборе территории под пастбище, хозяйственные и крупномасштабные постройки-гидростанции, детские или спортивные площадки и др.

Отбор проб проводят следующим образом. На обследуемой территории площадью до 1000м^2 выделяют два участка по 25м^2 (один-вблизи источника загрязнения, другой-в отдалении от него). На каждом из двух участков берут пробы из 5 точек (4-по углам участка, одну-в центре) на глубине 10-20см стерильным совком (из более глубоких мест с помощью специального бура Некрасова или Френкеля). Отбирают по 200-300г почвы в широкогорлые банки. На банки наклеивают этикетки, составляют сопроводительное письмо и отправляют с нарочным. Пробы почвы полагается исследовать сразу же или в течение 6-18ч, сохраняя их при температуре не выше $1-5^{\circ}\text{C}$.

В лаборатории пробы почвы измельчают, освобождают от камней, корней растений, просеивают через сито, тщательно перемешивают и отвешивают 30г. в колбу ёмкостью 500мл наливают 270мл стерильной водопроводной воды и, внося в неё отвешенную пробу почвы, всё интенсивно встряхивают в течение 10мин и, не давая отстояться частицам суспензии, готовят серию десятикратных последовательных разведений. Для относительно чистых почв достаточно 4 десятикратных разведений, для загрязнённых-6-9 разведений. Подготовленные таким образом пробы почвы исследуют: определяют общее микробное число, коли-титр почвы, перфрингенс-титр (количество анаэробных микроорганизмов) почвы.

Бактериологическое исследование воздуха

Воздух не является благоприятной средой для обитания микроорганизмов. Микробы попадают в воздух из почвы, с поверхности растений и др. количество и состав микрофлоры в воздухе непостоянны. Для санитарной оценки воздуха учитывают общее количество микробов в 1м^3 и

качественный состав (наличие санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов). Данные исследования осуществляют седиментационным, фильтрационным и аспирационным методами.

Седиментационный метод Коха заключается в том, что чашки Петри с МПА оставляют открытыми на 5-10мин в помещении. Затем чашки закрывают подписывают и помещают в термостат при комнатной температуре на 24 часа, после чего подсчитывают количество выросших колоний.

Чтобы определить микробное число в воздухе (количество бактерий, содержащихся в 1м^3) его подсчитывают по формуле Омелянского:

$$X = \frac{a \times 100 \times 1000 \times 5}{v \times 10 \times t}$$

Где: X – количество микробов в 1м^3 (1000дм^3) воздуха;

a – количество выросших колоний на чашках;

v – площадь чашки Петри;

t – время, в течение которого чашка была открыта;

5 – время по правилу Омелянского;

10 – объём воздуха в литрах (правилом Омелянского предусматривается, что на поверхности питательного агара в чашке Петри с площадью 100см^2 за 5 минут из воздуха оседает такое количество микробов, которое находится в 10дм^3).

Фильтрационный метод заключается в пропускании через специальную систему определённого объёма воздуха. Бактериоуловитель представляет собой стерильный сосуд с налитой в него сорбирующей жидкостью. Через приборы методом всасывания пропускается определённый объём воздуха (объём воздуха за единицу времени регулируется ротаметром). Микроорганизмы, содержащиеся в воздухе, сорбируются в жидкости, которую высевают на плотную питательную среду и после инкубирования подсчитывают число выросших колоний. Среди выросших колоний выделяют характерную по внешнему виду для искомого микроорганизма и изучают её с целью идентификации.

Взятие биологических материалов от людей и животных, как правило, осуществляют в больницах, ветеринарных клиниках или на животноводческих фермах. Для выделения патогенных микроорганизмов от людей забирают кровь, мочу, содержимое кишечника, мазки из зева, влагалища, содержимое желудка, а также пунктаты абсцессов, лимфатических желёз и др.

В ветеринарии для выделения и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний у животных забирают такие же биоматериалы.

Взятие биологического материала и его транспортировка для проведения бактериологического исследования являются наиболее ответственными этапами, обеспечивающими успех микробиологических исследований по выделению и идентификации микроорганизмов из различных клинических материалов. При взятии биологических материалов

персонал должен использовать спецодежду и средства индивидуальной защиты: халаты, резиновые перчатки, респираторы, защитные очки.

Общими требованиями к взятию и транспортировке биологического материала являются:

1. Соблюдение оптимальных сроков для взятия биологических материалов на исследование.

2. Взятие проб должно осуществляться с учётом места максимальной локализации возбудителя и возможных путей его выделения в окружающую среду.

3. Пробы должны отбираться в необходимом и достаточном объёме с обеспечением условий, исключающих его контаминацию посторонней микрофлорой.

4. Взятие биологического материала от людей и животных должно производиться строго до начала применения антибактериальных препаратов или не ранее чем через 10-14 суток после их отмены.

5. Отобранные пробы должны быть промаркированы. В сопроводительном документе-направлении необходимо указать: цель исследования, фамилию, имя, отчество, возраст, предполагаемый диагноз или показания к обследованию, дату взятия пробы.

6. Контейнеры для транспортировки материала должны обеспечивать герметичность, стерильность, целостность образцов.

7. Материал доставляется в лабораторию с учётом правил транспортировки для различных видов исследований и лицами, получившими специальный инструктаж. При транспортировке необходимо исключить вероятность контаминации собранного биологического материала.

2. Получение «накопительных» и «чистых» культур микроорганизмов

Как во внешней среде, так и в организме человека и животных микробы находятся в ассоциации с другими микроорганизмами. Биологические свойства микроорганизмов с целью установления их видовой принадлежности могут быть изучены только в том случае, когда микробы изолированы в чистой культуре. *Чистой культурой микроорганизмов называется такая культура микроорганизмов, которая состоит из особей одного вида.*

Получение «накопительных» культур микроорганизмов подробно рассматривалось при изучении курса «Микробиология» .в рамках этого курса

было три лабораторные работы по получению «накопительных» культур сульфатредуцирующих микроорганизмов, микроорганизмов нитрификаторов, азотфиксирующих и целлюлозоразрушающих. В основе получения «накопительных» культур микроорганизмов лежит использование специальных питательных сред, обеспечивающих преимущественное размножение искомым видов микроорганизмов. Например, при получении целлюлозоразрушающих микроорганизмов использовали питательную среду Гетчинсона (плотная питательная среда для получения аэробных культур целлюлозоразрушающих микроорганизмов) и жидкую питательную среду Имшенецкого (для анаэробных культур микроорганизмов).

В состав этих питательных сред не входят источники углерода, а в качестве источника углерода используется фильтровальная бумага (распушенная целлюлоза).

Выделение чистой культуры является основой всей бактериологической работы. При этом получение чистой культуры будет успешным, если данный микроорганизм присутствует в смешанной популяции в достаточно высокой концентрации, т.е. если он количественно преобладает в смешанной популяции. Разработанные методы накопления или обогащения популяции (получение «накопительных» культур) имеет целью добиться увеличения относительного количества данного микроорганизма благодаря созданию лучших условий для их роста по сравнению с другими видами или путём пространственного отделения его от других членов популяции. Для этих целей могут быть использованы физические, химические или биологические методы.

К физическим методам следует отнести регуляцию роста микроорганизмов температурой инкубирования (психрофилы, термофилы), тепловую обработку, ультрафиолетовое облучение, ультразвуковую обработку, приводящее к гибели или подавлению роста контаминирующих микроорганизмов, присутствующих в популяции (например, споровые формы, которые обладают устойчивостью к воздействию этих физических факторов).

В химических методах используют токсичные вещества, которые ингибируют рост контаминирующих видов микроорганизмов, не влияя на искомый (выделяемый) микроорганизм (например, антибиотики, некоторые анилиновые красители и др.).

Биологические методы включают использование специфических хозяев для выделения «чистой» культуры микроорганизмов. Наиболее характерный пример использования биологического метода выделения «чистой» культуры микроорганизма это пассаж через лабораторных животных. Но этот метод

применим только для патогенных видов микроорганизмов. Этот же методический подход используется для получения культур патогенных микроорганизмов, обладающих наиболее выраженными вирулентными свойствами, внутри одного вида. В процессе длительного хранения штаммов микроорганизмов на искусственных питательных средах или в лиофилизированном виде в популяции накапливаются бактерии, имеющие различные мутации, которые влияют на биологические свойства бактерий. Для того чтобы вернуть популяцию в исходное состояние и избавиться от мутировавших бактерий используют пассажи через организм лабораторных животных. При этом необходимо использовать вид животных, чувствительных к данной инфекции, выбрать наиболее естественный путь заражения этих животных и подбирать дозу заражения.

При работе с культурами неизвестных видов микроорганизмов простейшим способом получения «чистых» культур является механическое разделение микробов друг от друга на поверхности плотной питательной среды. В этих случаях используется метод посева по Дригальскому. Рассевают исследуемую пробу, как правило, на три агаровые пластинки: стерильной бактериологической петлёй набирают каплю посевного материала и наносят её на поверхность питательного агара первой чашки. При помощи стерильного шпателя каплю растирают по поверхности первой агаровой пластинки круговыми движениями. Затем этим же шпателем, не обжигая его в пламене горелки, растирают оставшийся материал по поверхности второй, а затем и третьей агаровой пластинки. При таком способе посева в первой чашке вырастает большое количество колоний, а во второй и третьей получается разрозненный рост отдельных колоний, т.е. соблюдается основной принцип выделения «чистых» культур – механическое разделение. С помощью бактериологической петли осторожно отбирают отдельно растущую колонию (лучше несколько клоновых культур), чтобы не задеть другие колонии, и переносят её на поверхность новой агаровой пластинки. С помощью шпателя микробную массу, отобранную из одной (или нескольких морфологически одинаковых) колонии, растирают по поверхности питательного агара и далее рассевают ещё на две агаровые пластинки (второй посев по методу Дригальского). Посевы помещают в термостат и инкубируют при температуре оптимальной для роста выделяемого вида микроорганизмов. Выросшие колонии изучают при внешнем осмотре с помощью лупы или при малом увеличении под микроскопом. Если все выросшие колонии имеют одинаковую морфологию (внешний вид, поверхность, ослизненность, край колонии, цвет, структура и др.), то можно с большой долей вероятности предположить, что удалось

отобрать чистую культуру микроорганизмов. Если на поверхности питательного агара обнаруживаются колонии с иной морфологией, то это свидетельствует о присутствии посторонней микрофлоры в выделенной культуре. В этом случае процедуру посева по методу Дригальского и отбора клоновых культур с искомой (типичной) морфологией повторяют.

Для повышения эффективности отбора не контаминированных посторонней микрофлорой чистых культур, целесообразно использование селективных питательных сред, обеспечивающих хороший рост колоний искомого вида микроорганизмов и подавление роста посторонней микрофлоры. Наиболее эффективно использование для этих целей питательных сред с антибиотиками.

Для выделения «чистых» культур патогенных микроорганизмов из проб, сильно контаминированных посторонней микрофлорой, целесообразно использование метода пассажей через организм восприимчивых лабораторных животных.

Из поступивших биопроб готовят суспензию в стерильном физиологическом растворе хлористого натрия. При необходимости фильтруют через несколько слоёв марли или отсасывают жидкую фракцию с помощью шприца с надетой иглой (отстаивать нельзя, потому что бактерии оседают на дно). Полученный фильтрат вводят 5-8 мышам или морским свинкам, или другим видам лабораторных животных, чувствительных к данной инфекции. Для заражения используют способ, который позволяет моделировать данную инфекцию (подкожно, внутрибрюшинно, внутривенно, внутримышечно, интрацеребрально).

В живом организме способностью размножаться обладают только патогенные виды микроорганизмов. Все сапрофитные виды или погибают или не размножаются. Выделение «чистых» культур патогенных организмов из органов погибших или больных животных осуществляют путём посева на питательный агар. Нельзя выделять «чистую» культуру из места введения, поскольку в месте введения, как правило, посторонняя микрофлора сохраняется длительное время и при посеве на питательный агар она начинает быстро размножаться и не позволяет выделить чистую культуру искомого микроорганизма.

На заключительном этапе выделения «чистой» культуры микроорганизмов проводят тщательное исследование изолятов. Их изучают с помощью микроскопии окрашенных по Граму мазков, с помощью специфических бактериофагов («фаговые» дорожки), а также по культурально-морфологическим свойствам клоновых культур при посеве на питательном агаре до единичных колоний, и при выращивании в жидкой

питательной среде (пристеночный или диффузный рост, образование плёнки на поверхности, изменение цвета питательной среды за счёт образования пигмента.

Отобранные после проверки на чистоту культуры микроорганизмов сеют на полужидкий агар или скошенный в пробирках агар, подрачивают и хранят в холодильнике при температуре 6-8⁰С. Для хранения выделенных чистых культур микроорганизмов засевают не менее двух пробирок. Из них одна пробирка с посевами используется при исследовании выделенной культуры, а вторая пробирка остаётся нетронутой. Она будет использована при последующих пересевах культуры или в случае контаминации культуры в первой пробирке другими видами.

Тема №4

«Использование биохимических тестов для идентификации микроорганизмов»

Вопросы:

1. Брожение
2. Газы, образуемые микроорганизмами в процессе брожения
3. Протеолиз.
4. Расщепление жиров (липолиз)
5. Реакции восстановления
6. Определение «редуктазы»
7. Определение индола
8. Определение продукции каталазы

Изучение биохимических свойств является одним из основных методов при видовой идентификации микроорганизмов. Синтез различных ферментов определяет способность микроорганизмов разлагать углеводы, белки, жиры с образованием специфических продуктов распада. Биохимическая активность разных видов микроорганизмов имеет свои специфические особенности, присущие конкретному виду. Кроме того, синтез определённого набора ферментов, обуславливающих биохимические свойства разных видов микроорганизмов, является одним из наиболее стабильных признаков, что позволяет их использовать при видовой идентификации.

При изучении биохимических свойств микроорганизмов важным условием получения воспроизводимых достоверных результатов является стандартизация условий проведения экспериментов. Необходимо обеспечить условия, при которых достигается интенсивный рост микроорганизмов. Например, установлено, что для образования газа при расщеплении лактозы в 1мл питательной среды должно содержаться не менее 40-300млн микроорганизмов. Поэтому, если не удаётся добиться интенсивного роста, отрицательный результат биохимического теста не должен учитываться. Для получения воспроизводимых достоверных результатов рекомендуется всегда использовать проверенные методики. При использовании эмпирически подобранных сложных органических питательных сред, например, мясного бульона, результаты могут варьировать в зависимости от количества и качества таких ингредиентов, как пептон, дрожжевой экстракт, мясной гидролизат, от рН среды, от температуры инкубирования и других факторов.

В рамках данной лекции не будем рассматривать определение способности микроорганизмов ферментировать углеводы и спирты с использованием «пёстрога ряда Гисса», поскольку вы этот тест хорошо знаете и использовали на лабораторных занятиях.

1. Брожение

Для изучения способности каких-либо микроорганизмов вызывать то или иное брожение в каждую пробирку с питательным субстратом, содержащим испытуемый субстрат (например, углевод, аминокислоту и др.) перед стерилизацией помещают перевёрнутую вверх дном пробирку, для того, чтобы уловить газ, образующийся при брожении. В противном случае газ рассеивается и остаётся незамеченным. Два вида микроорганизмов, обладающих одинаковой способностью сбраживать углевод, можно легко отличить один от другого, если один из них газ не образует, а другой образует.

Образование газа за счёт способного сбраживаться субстрата в результате роста микроорганизмов служит бесспорным доказательством брожения и практически всегда сопровождается закислением среды, так как газ образуется в результате распада муравьиной или других органических кислот-промежуточных продуктов метаболизма углеводов.

В тех случаях, когда образования газа не происходит, доказательством того, что микроорганизм способен сбраживать углевод или другой субстрат, служит закисление или, в некоторых случаях, защелачивание питательной среды.

Изменение рН питательной среды выявляют по изменению окраски индикаторного красителя, который вносят в питательную среду в процессе её приготовления. Например, бромтимоловый синий в присутствии кислоты становится жёлтым. Цвет фенолового красного в щелочной среде меняется из жёлтого на красный.

Некоторые виды микроорганизмов способны использовать и кислоты, которые образуются в процессе брожения. Другие виды из аминокислот образуют аммиак в количествах, достаточных для нейтрализации образующихся органических кислот. Кроме того, образование кислот или щелочных продуктов иногда маскируется буфером, который добавлен в питательную среду. Эти особенности всегда следует учитывать при постановке экспериментов.

Следует также отметить, что учёт результатов при изучении биохимических свойств микроорганизмов, следует проводить ежедневно в течение не менее 5 суток, а в некоторых случаях в течение 20-25 суток.

2. Газы, образуемые микроорганизмами в процессе брожения

В процессе брожения, как правило, выделяются водород и углекислый газ. Относительное содержание этих газов можно установить отмечая вначале уровень накопившегося газа в перевёрнутых вверх дном пробирках и добавляя затем в культуральную жидкость концентрированный раствор натриевой щёлочи (NaOH). Щёлочь поглощает углекислый газ и в пробирке остаётся только водород. По изменению объёма газа в пробирке можно определить долевое соотношение этих газов.

Сероводород. Многие микроорганизмы способны в процессе метаболизма использовать серосодержащие органические соединения. При этом выделяется значительное количество сероводорода (H_2S). При гниении органических остатков обычно ощущается запах именно этого газа. Способность некоторых видов микроорганизмов образовывать сероводород используется при видовой идентификации. Например, *Salmonella paratyphi B* (возбудитель паратифа) образует сероводород, а близкородственный вид *Salmonella paratyphi A* этого газа не образует.

Существует несколько методов обнаружения сероводорода: применение индикаторной полоски фильтровальной бумаги, пропитанной 10% раствором уксуснокислого свинца и метод укола. При использовании первого метода выделение сероводорода определяют по почернению индикаторной полоски, подвешенной над жидкой питательной средой. При втором способе выделение сероводорода определяют по почернению агаризованной питательной среды, в которую был добавлен уксуснокислый свинец.

Метан. Другой газообразный продукт метаболизма бактерий-метан (CH_4). Он является продуктом жизнедеятельности некоторых видов анаэробных микроорганизмов. Углерод является хорошим акцептором водорода и легко восстанавливается.

В болотах анаэробные бактерии расщепляют углеводы, содержащиеся в растительных остатках, при этом выделяется большое количество метана. Пузырьки газа, поднимающиеся на поверхность болот, состоят в основном из метана. При сбраживании сточных вод, богатых органическими веществами, образуется большое количество метана, который можно использовать в качестве топлива.

Аммиак и азот. Многие бактерии, в особенности сапрофиты, при расщеплении белков и других азотсодержащих веществ, а также при восстановлении нитратов и нитритов образуют аммиак и азот. Как и углерод, азот легко восстанавливается.

3. Протеолиз.

Одним из важнейших идентификационных свойств микроорганизмов является протеолиз-способность гидролизовать белковые соединения. Для выявления этих свойств микроорганизмов используют несколько тестов. Один из таких тестов-гидролиз желатина.

Считается, что если микроорганизмы вызывают гидролиз неполноценного белка желатины (в результате чего желатина утрачивает способность желироваться на холоду), то данный вид микроорганизмов способен вызывать гидролиз всех белков. Хотя из этого правила есть исключения. Тем не менее желатину используют для определения протеолитических свойств микроорганизмов.

Метод выявления гидролиза желатины заключается в следующем. Готовят питательный агар, содержащий 1% желатины и разливают его по пробиркам из расчёта по 2мл в каждую. Пробирки с питательной средой стерилизуют, после чего среде дают затвердеть. Пробирки засевают

исследуемой культурой (возраст 6-8 часов) и инкубируют 3-5 часов, затем сверху на среду наслаивают несколько капель интенсивно коагулирующей жидкости (H_2O) – 100мл, $HgCl_2$ – 15г, HCl – 20мл). гидролиз выявляется по наличию светлой зоны в верхнем слое питательного агара с желатиной. Иногда зона гидролиза видна и без добавления коагулирующего раствора.

Ещё один тест для выявления протеолитических свойств микроорганизмов – это гидролиз казеина. Для постановки этого теста используют молочный агар Эйкмана.

Свежее молоко имеет рН 6,8 и является хорошей питательной средой для многих видов микроорганизмов. Снятое молоко разливают по 5мл по пробиркам и стерилизуют в автоклаве при температуре 120^0 С в течение 10мин. Если к молоку добавить индикатор, например, лакмус или бромтимоловый синий, то по изменению окраски можно выявить способность исследуемых микроорганизмов сбраживать лактозу. О способности микроорганизмов синтезировать сычужный фермент можно судить по свёртыванию молока. Однако при этом следует учитывать, что такое свёртывание может быть связано и со сбраживанием лактозы и закислением среды. Если после свёртывания молока оно становится коричневым и полупрозрачным, а сгусток растворяется- это свидетельствует о гидролизе казеина.

Для определения способности микроорганизмов гидролизовать казеин также используют молочный агар Эйкмана. Для выявления этой способности к 10мл стерильного расплавленного на водяной бане мясо-пептонного агара добавляют, соблюдая правила асептики, 3мл снятого стерильного молока. Перед приготовлением питательной среды молоко обезжиривают центрифугированием в течение 15 минут при 2000-3000 об/мин с удалением поверхностной плёнки и стерилизуют при 0,5атм в течение 20 минут. Полученную питательную среду разливают в чашки Петри. Среду используют без дополнительной стерилизации, т.к. совместная стерилизация молока с агаром приводит к свёртыванию казеина с образованием хлопьев. Бактерии высевают штрихом. Продолжительность культивирования 2-10 суток. Гидролиз казеина обнаруживают по зоне просветления среды вокруг колоний, выросших по штриху микроорганизмов. Особенно чётко она видна после обработки среды раствором 5% трихлоруксусной кислоты. Зону гидролиза казеина измеряют в мм от края колоний до границы светлой зоны. Чем больше диаметр светлой зоны, тем выше казеинолитическая активность бактерий.

4. Расщепление жиров (липолиз)

Некоторые виды микроорганизмов образуют ферменты, которые гидролизуют липиды. Одна из трудностей изучения липолитической активности микроорганизмов заключается в том, что липазы плохо диффундируют в толщу питательного агара. Кроме того, у некоторых видов микроорганизмов синтезируются только после контакта микроба с

соответствующим субстратом (индуцибельный синтез). Сложности возникают и при выявлении липолитического действия.

Один из методов позволяющих выявить липолитическую активность у микроорганизмов, заключается в следующем. Агаровую пластинку засевают полосками исследуемых культур микроорганизмов. Затем на поверхность питательного агара тонким слоем разбрызгивают масло. После инкубирования под микроскопом исследуют капельки масла на поверхности питательного агара. Капельки гидролизованного жира легко отличить, так как они утрачивают свою прозрачность.

Ещё один метод определения липолитической активности микроорганизмов заключается в использовании вместо жиров, не смешивающихся с водой, различных водорастворимых жироподобных веществ (твинов). Твины добавляют в питательные среды. Гидролиз твинов легко выявляется по образованию непрозрачных зон кальциевых солей (мыл) вокруг выросших колоний.

5. Реакции восстановления

Отличительной чертой некоторых видов микроорганизмов является их способность восстанавливать различные соединения (т.е. использовать их в качестве акцепторов водорода).

Восстановление нитратов

Для оценки способности микроорганизмов восстанавливать нитраты до нитритов их выращивают в питательном бульоне, содержащем 1% нитрата (NaNO_3). В процессе инкубирования через каждые 48 часов проверяют образование в культуре нитритов (NaNO_2). Для этого со дна пробирки берут небольшое количество культуральной жидкости и добавляют к ней каплю раствора сульфаниловой кислоты и каплю диметил- α -нафтиламина.

Раствор сульфаниловой кислоты:

Ледяная уксусная кислота..... 100мл

Вода250мл

Сульфаниловая кислота..... 2,8г

Раствор диметил- α -нафтиламина:

Ледяная уксусная кислота..... 100мл

Вода.....250мл

Диметил- α -нафтиламин.....2,1г

Надо проводить исследование придонных слоёв культуральной жидкости не перемешивая всю культуру, так как слабое восстановление происходит иногда лишь в нижних слоях культуры в условиях низкого содержания кислорода. В верхних слоях культуральной жидкости присутствие кислорода задерживает восстановление нитратов (нитратредуктаза-её синтез ингибируется в аэробных условиях).

Красное или коричневое окрашивание свидетельствует о присутствии нитритов. Если окрашивания не появилось, то следует рассматривать две причины:

А) либо восстановления нитратов не произошло и поэтому нитриты не появились;

Б) либо нитриты образовались, но в свою очередь быстро восстановились до аммиака или свободного азота.

Для того, чтобы проверить исчезли нитраты или нет, добавляют небольшое количество порошка цинка. Цинк восстанавливает нитраты. Наличие нитритов устанавливают в пробе с дифениламином. Этот тест позволяет установить, действительно ли микроорганизмы восстановили все имеющиеся в питательной среде нитраты. Если при отрицательной пробе на нитриты проба с цинком окажется положительной (т.е. будет установлено, что нитраты содержатся в культуре), то станет очевидно, что микроорганизмы данного вида не обладают способностью восстанавливать нитраты. Если обе пробы отрицательны, то ясно, что микроорганизмы восстановили все нитраты в нитриты, а нитриты в свою очередь, восстановились до аммиака или азота и улетучились.

Определение «редуктазы»

Некоторые виды микроорганизмов способны обесцвечивать метиленовый синий. Этот тест раньше использовался для оценки качества молока на фермах и пунктах приёма молока. С этой целью к пробе молока добавляют раствор метиленового синего. Если в молоке содержится много микроорганизмов, то синяя окраска молока быстро исчезает.

Для определения «редуктаз» кроме метиленового синего применяют и другие индикаторные красители, например, соли тетразолия, нейтральный красный и резазурин.

6. Определение индола

Индол-производное аминокислоты триптофан-образуется в результате её гидролиза некоторыми видами микроорганизмов. Триптофан содержится в большинстве пептонов, но при постановке теста лучше его добавить в питательную среду.

Исследуемую культуру микроорганизмов инкубируют в среде с триптофаном в течение 48-72 часов. Затем в пробирку с культуральной средой добавляют 1мл ксилола и встряхивают. Индол растворим в ксилоле и концентрируется в нём. После кратковременного отстаивания (1-3 минуты) ксилол с растворённым в нём индолом всплывает вверх. Затем к культуре осторожно добавляют несколько капель реактива Эрлиха, таким образом, чтобы реактив образовал слой между ксилолом и культуральной жидкостью.

Состав реактива Эрлиха в модификации Ковача:

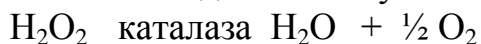
Амиловый или бутиловый спирт	75мл;
Соляная кислота (конц.)	25мл;
n-диметиламинобензальдегид	5г.

Если в культуре содержится индол, то через несколько минут на границе ксилола и культуральной жидкости образуется розовое кольцо.

Следует учитывать, что при длительном стоянии реактив даёт розовое окрашивание, обусловленное не индолом, а другими соединениями.

7. Определение продукции каталазы

Каталаза-фермент, катализирующий расщепление перекиси водорода с образованием воды и молекулы кислорода:



Этот фермент синтезируют многие виды микроорганизмов, преимущественно аэробы и в редких случаях анаэробы. Отсутствие или наличие этого фермента служит важным идентификационным признаком, в особенности для микроорганизмов семейства *Lactobacteriaceae*.

Метод выявления каталазы заключается в следующем. На питательный агар засевают исследуемую культуру и инкубируют 24-48 часов при оптимальной для роста данной культуры температуре. Выросшие колонии микроорганизмов заливают 3%-раствором перекиси водорода. При наличии каталазы начинается хорошо видимое невооружённым глазом выделение пузырьков кислорода.

Одно из условий постановки эксперимента-pH питательной среды должно быть равно приблизительно 7,0.

Питательный агар не должен содержать крови (гемоглобина).

Тема №5

«Безопасность работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности»

Вопросы:

1. Группы патогенных микроорганизмов
2. Лаборатории разных групп риска
3. Требования к организации работ с ПБА III и IV групп патогенности
4. Требования к проведению работ в лабораториях
5. Требования к порядку использования средств индивидуальной защиты
6. Требования к обеззараживанию материала и уборке помещений
7. Мероприятия при локализации и ликвидации последствий аварий

1. Группы патогенных микроорганизмов

Регламентация условий работы с патогенными микроорганизмами произведена в соответствии со степенью их опасности для человека. По этому признаку все патогенные микроорганизмы разделены на 4 группы.

Группа I-возбудители особо опасных инфекций: чума, натуральная оспа, лихорадка Ласса, Эбола и др. (В соответствии классификацией ВОЗ в группу 1 включены возбудители туляремии, бруцеллёза, холеры, сибирской язвы, сапа и мелиоидоза).

Группа II-возбудители опасных бактериальных, грибковых и вирусных инфекций: легионеллёз, лихорадка Скалистых гор, сыпной тиф, бластомикоз, бешенство и др. В эту группу также включен ботулотоксин (но не сам продуцент экзотоксина-*Clostridium botulinum*). По классификации Госсанэпиднадзора России в эту группу включены возбудители туляремии, бруцеллёза, сибирской язвы, холеры, сапа и мелиоидоза.

Группа III-возбудители бактериальных, грибковых, вирусных и протозойных инфекций, выделенных в отдельные нозологические формы (возбудители коклюша, столбняка, ботулизма, туберкулёза, конидиомикоза, малярии, гриппа, лейшманиоза, полиомиелита и др.). в эту группу также включены аттенуированные штаммы бактерий 1, 2 и 3 групп патогенности.

Группа IV-возбудители бактериальных, вирусных и грибковых септицемий, менингитов, пневмоний, энтеритов, токсикоинфекций и др. (эшерихиозы, сальмонеллёзы и др.).

2. Лаборатории разных групп риска

В зависимости от уровня безопасности работ с микроорганизмами лаборатории подразделяются на четыре группы риска.

I группа риска-лаборатории особого режима (максимально изолированные) с высоким индивидуальным и общественным риском.

2 группа риска-режимные лаборатории (изолированные) с высоким индивидуальным и низким общественным риском.

3 группа риска-базовые (основные) лаборатории с умеренным индивидуальным и ограниченным общественным риском.

4 группа риска-базовые (основные) лаборатории с низким индивидуальным и низким общественным риском.

3. Требования к организации работ с ПБА III и IV групп патогенности

Базовые лаборатории, работающие с ПБА III и IV групп патогенности, должны располагаться в отдельном здании или в изолированной части здания. Они должны иметь два выхода: один для сотрудников, второй для доставки материала для исследований (допускается передача материалов через передаточное окно или шлюз). В лабораториях ВУЗов, научно-исследовательских институтов и на предприятиях по выпуску бактериальных препаратов допускается наличие одного входа. Лаборатории должны иметь необходимый набор помещений в соответствии с производственной мощностью и номенклатурой выполняемых исследований. В них должны быть проведены водопровод, электричество, отопление и вентиляция. В системе водоснабжения должны быть предусмотрены отдельные сети подачи воды: для лабораторных исследований и бытовых нужд (сеть питьевой воды). Они должны быть защищены от обратного тока воды из лабораторной сети (бак разрыва струи).

Вентиляция должна быть приточно-вытяжной, при этом наиболее низкое давление вытяжной вентиляции должно быть в помещениях с наибольшей опасностью инфицирования. Вентиляция оснащается фильтрами тонкой очистки воздуха. Помещения должны иметь хорошее освещение.

Каждая лаборатория должна иметь «чистую» и «заразную» зоны. Их планировка и размещение оборудования должны обеспечивать «проточность» продвижения ПБА по «заразной» зоне.

«Заразная» зона включает помещения для приёма и регистрации проб, боксы и комнаты для проведения микробиологических исследований, оборудованная вытяжными шкафами (боксами), помещения для проведения серологических исследований, термальные комнаты для культивирования микроорганизмов, автоклавная для обеззараживания отработанного материала и посуды. Окна и двери всех помещений «заразной» зоны должны герметично закрываться. Приточно-вытяжная вентиляция «заразной» зоны должна быть оборудована фильтрами тонкой очистки выбрасываемого воздуха, а на воздуховодах должны быть установлены автоматические клапаны, закрывающиеся при отключении электричества, чтобы не было обратного тока воздуха. Во всех помещениях и в вытяжных боксах должны быть установлены ультрафиолетовые бактерицидные лампы. Покрытия

столов, стен, полов, оборудования должны быть гладкими и устойчивыми к действию моющих средств и дезинфектантов.

«Чистая» зона включает гардеробную для верхней одежды, комнату отдыха, рабочие кабинеты для работы с документами, подсобные помещения, помещения для подготовительных работ (препараторскую), автоклавы для стерилизации питательных сред и лабораторной посуды.

На границе «заразной» и «чистой» зон должен быть проходной санпропускник, оборудованный раздевалками для чистой (домашней) и рабочей одежды, и душевой для гигиенической помывки при выходе из «заразной» зоны.

В чистой зоне допускается проведение исследований с инактивированными ПБА (серологические и биохимические исследования; методики должны быть аттестованы).

Помещения лабораторий должны быть не проницаемы для грызунов и насекомых.

4. Требования к проведению работ в лабораториях

К самостоятельной работе с ПБА III-IV групп патогенности допускаются специалисты с высшим и средним специальным образованием, прошедшие соответствующую подготовку.

Приборы и оборудование, используемые в работе лаборатории, должны быть аттестованы, технически исправны, иметь технический паспорт.

На каждый прибор должны быть разработаны правила (инструкции) по их эксплуатации с учётом требований биологической безопасности.

В лаборатории должны использоваться дезинфицирующие средства, допущенные к применению в установленном порядке.

Доставка в лабораторию материала для исследования осуществляется в контейнерах. Доставляемые ёмкости с жидкими материалами должны быть закрыты пробками, исключающими выливание содержимого во время транспортировки. Дно контейнеров должно быть покрыто адсорбирующим материалом, смоченным дезраствором. Не допускается транспортировка материала в хозяйственных сумках, чемоданах и др. предметах личного пользования.

Во время работы двери боксов и предбоксов должны быть закрыты. Выход и вход в боксы во время проведения работы запрещён. Бокс должен быть оснащен средствами сигнализации на случай аварии (внутренняя связь, телефон).

Все работы с патогенными материалами выполняются двумя специалистами (принцип парности).

При пипетировании жидких материалов разрешается пользоваться только резиновыми грушами или автоматическими пипетками. Категорически запрещено пипетировать ртом.

Перед использованием вся стеклянная посуда должна быть проверена на отсутствие трещин и сколов по краям.

Ампулы с высушенными культурами 3-4 групп патогенности вскрывают стерильно над лотком с ватно-марлевым ковриком, смоченным дезраствором. Верхний конец ампулы нагревают над пламенем горелки, затем на кончик ампулы капают стерильный физраствор так, чтобы образовалась круговая трещина. После образования трещины конец ампулы накрывают стерильной салфеткой или ватным тампоном и обламывают пинцетом. Ватный тампон или салфетку с обломком ампулы замачивают в отдельной ёмкости с дезраствором.

По окончании работы все ёмкости, содержащие ПБА должны быть убраны в термостат или в холодильник. Ненужные материалы складывают в отдельную ёмкость для обеззараживания методом автоклавирования или замачивания в дезрастворе.

Поверхности шкафов, оборудования, использовавшееся в работе, освободившееся из-под материалов ёмкости (вторичная тара) подлежит обязательной дезинфекции (текущая дезинфекция).

Слив необеззараженных жидких отходов в канализацию строго запрещён.

Перенос ПБА и использованной посуды (пробирки, чашки Петри, пипетки и др.) для обеззараживания должен осуществляться в закрытых ёмкостях (ящиках), исключая инфицирование во время транспортировки.

В случае обеззараживания пробирок, колб, цилиндров, центрифужных стаканов в дезрастворе их погружают в дезраствор таким образом, чтобы внутри не оставалось пузырьков воздуха, а обеззараживаемый сосуд должен быть полностью погружён в дезраствор.

После завершения работ материал убирают в термостат (термальную комнату) или в холодильник. На вторичную тару вешают табличку, на которой указывают вид микробных культур, количество первичных укупок (пробирок, чашек Петри, флаконов и др.), фамилия ответственного лица, номер личной печати и дата постановки эксперимента.

Вынос из лаборатории оборудования, лабораторной посуды, инструмента, реактивов, документации и др. разрешается только после дезинфекционной обработки. Все сотрудники, работающие с ПБА I-IV групп патогенности, должны находиться под диспансерным наблюдением. При появлении у сотрудников симптомов, характерных для инфекционного заболевания, вызываемого возбудителем, с которым он работал, сотрудник обязан обратиться за медицинской помощью и поставить в известность руководителя лаборатории.

4. Требования к порядку использования средств индивидуальной защиты

Сотрудники лаборатории должны быть обеспечены медицинскими халатами, рабочими костюмами, шапочками, сменной обувью и другими средствами индивидуальной защиты в зависимости от характера выполняемой работы и в соответствии с действующими нормами.

Рабочая одежда и обувь должны быть индивидуальными, соответствовать размерам работающего персонала и храниться отдельно от личной одежды (на «заразной» половине проходного санпропускника).

При проведении исследований с ПБА III-IV групп патогенности одевается дополнительный защитный комплект одежды, включающий противочумный халат (длинной до нижней трети голени), косынка спецпокроя, две пары резиновых перчаток, респиратор типа «Лепесток 200», резиновые сапоги, резиновый или пластиковый халат. Одевание спецкомплекта проводится в тамбуре (предбокнике) лабораторного бокса. После окончания работы с ПБА III-IV групп патогенности все материалы и использованная посуда убираются (холодильники, термостаты или ящики для автоклавирования), проводится текущая дезинфекция рабочих столов и оборудования. Дезинфекции подвергается и спецодежда, которая затем снимается и вешается для просушивания в тамбуре лабораторного бокса.

6. Требования к обеззараживанию материала и уборке помещений

Методы и средства дезинфекции при работе с ПБА III-IV групп патогенности определяются в каждом отдельном случае в зависимости от вида ПБА и характера обеззараживаемого материала.

В лаборатории должен храниться минимум недельный запас дезинфицирующих средств.

Вновь поступающие на склад серии дезинфицирующих средств необходимо контролировать на содержание действующего вещества.

Дезинфицирующие растворы готовят непосредственно в лаборатории. на ёмкости с дезинфицирующим раствором должно быть указано его название: «1% раствор монохлорамина Б», концентрация и дата приготовления. Учёт приготовления дезинфицирующих растворов ведётся в отдельном журнале, в котором указывается: дата приготовления, вид дезинфицирующего раствора, ФИО лица, приготовившего раствор.

При автоклавировании материалов и посуды, контаминированной ПБА III-IV групп патогенности, перенос материалов осуществляется в специальных ёмкостях (баках, ящиках, вёдрах и др.) внутрь вторичной тары вкладывается опись, в которой указывается: предупреждающая надпись «ОПАСНО», количество пробирок, чашек Петри, флаконов и др., вид материала, ФИО ответственного, дата. В каждый ящик вкладывается индикаторная трубка с бензойной кислотой или специальные индикаторные

полоски, которые позволяют контролировать температурный режим непосредственно в ёмкости с материалом. После завершения автоклавирования, если бензойная кислота в трубках не расплавилась или индикаторная полоска не изменила свой цвет, процесс автоклавирования повторяют вновь.

Текущая уборка помещений проводится ежедневно влажным способом после окончания рабочего дня. Уборочный инвентарь должен быть промаркирован отдельно для «чистой» и «заразной» зон. Перенос инвентаря из зоны в зону не допускается.

Стеклянные поверхности бактерицидных ламп протирают ветошью, смоченной этиловым спиртом, не реже 1 раза в неделю. Учёт работы бактерицидных ламп ведётся в отдельном журнале, который находится в лаборатории. Эффективность работы бактерицидных ламп проверяется не реже одного раза в год с использованием микробных тест-культур.

8. Мероприятия при локализации и ликвидации последствий аварий

При авариях работу с ПБА немедленно прекращают, место, где произошёл разлив материала или разбитая посуда с ПБА, накрывают ветошью, обильно смоченной дезраствором, по телефону сообщают руководителю лаборатории о случившемся, и принимают следующие меры:

все открытые участки тела обрабатывают 70% этиловым спиртом;

при попадании инфекционного материала на слизистые или в глаза их немедленно обрабатывают: глаза-1% раствора протаргола (AgNO_3); в нос закапывают, а рот и горло прополаскивают 0,05% раствором марганцевокислого калия или 1% раствором борной кислоты.

При повреждении кожных покровов перчатки обрабатывают дезраствором, снимают, из ранки выдавливают капельку крови и обрабатывают 70% раствором этилового спирта и смазывают раствором йода.

Для обработки помещения, в котором произошла авария привлекают аварийную бригаду.

Защитная одежда пострадавших сотрудников (всех, находившихся в лаборатории в момент аварии, если это было связано с образованием аэрозоля) снимается и замачивается в дезрастворе. Одевается комплект чистой одежды и проходят в санпропускник для принятия гигиенического душа.

Решение о проведении лечебно-профилактических мероприятий в отношении пострадавших сотрудников принимают соответствующие руководители медицинской службы, комиссии по контролю за соблюдением требований биологической безопасности, руководители лаборатории, в которой произошла авария. В некоторых случаях, когда вероятность образования аэрозоля в момент аварии была минимальной, за лицами,

находившимися в помещении, где произошла авария, устанавливается медицинское наблюдение на срок инкубационного периода.

В лабораториях для ликвидации последствий аварии, а также профилактики возможного поражения персонала, должна быть аптечка для оказания экстренной медицинской помощи, запас дезинфицирующих средств, СИЗ, комплекты сменной одежды. Гидропульт или автомакс, носилки должны храниться отдельно-с имуществом аварийной бригады. Ответственным за комплектование аптечки экстренной медицинской помощи является руководитель подразделения.

Тема № 6

«Идентификация микроорганизмов с использованием иммунохимических методов»

Вопросы:

1. Биохимические основы серологических реакций.
2. Основные серологические реакции, используемые для идентификации микроорганизмов
 - 2.1 Реакция агглютинации
 - 2.2 Реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации
 - 2.3 Реакция связывания комплемента (РСК)
 - 2.4 Серологические реакции с использованием метки
 - 2.5 Иммуноферментный анализ (ИФА)
 - 2.6 Иммуноблотинг
 - 2.7 Получение моноклональных антител путём слияния клеток (гибридомная технология)

1. Биохимические основы серологических реакций.

Во всех иммунохимических реакциях основным компонентом являются антигены микробной клетки-вещества белковой природы, обладающие двумя основными свойствами: способностью вызывать иммунный процесс в организме и соединяться с антителами в серологических реакциях.

Микробная клетка представляет собой сложный антигенный комплекс. С телом микробной клетки связан соматический антиген (от лат. soma-тело), представляющий фактически смесь антигенов клеточной стенки, протоплазмы. Этот антиген обозначается буквой «О». у микробов, имеющих жгутики, имеется жгутиковый антиген-«Н». микроорганизмы, имеющие капсулу, обладают капсульным антигеном-«К».

Разные виды микробов имеют различные видовые антигены, специфичные для каждого вида, и типовые антигены; обуславливающие существование различных серологических типов внутри вида (группа кишечных бактерий: кишечная палочка, сальмонеллы и др.).

Родственные между собой виды микробов могут иметь общие или групповые антигены. Например, бактерии кишечной группы-*Salmonella* имеют общие антигены.

При введении в организм животного антигены стимулируют образование особых белковых веществ - антител, относящихся к γ -глобулиновой фракции сыворотки крови. Специфической особенностью антител является их способность образовывать соединения с соответствующими антигенами. Выявляются специфические антитела в тестах *in vitro*. Для этого к сыворотке крови, содержащей антитела, прибавляют антигены в виде убитых микроорганизмов или очищенных

фракций отдельных антигенов, полученных из этих микроорганизмов. Внешним проявлением реакции взаимодействия антигена с антителом является агглютинация, т.е. образование видимых хлопьев вследствие скучивания и склеивания целых микробных клеток; преципитация-осаждение видимого осадка, состоящего из вступивших друг с другом в соединение белков (антигенов) и антител; бактериолиз - разрушение микробных клеток под воздействием антител.

Реакции взаимодействия антитела с антигеном получили название серологических (от лат. serum-сыворотка).

Серологические реакции отличаются высокой специфичностью. Это позволяет использовать их для обнаружения в сыворотке крови антител к тому или иному микробу с помощью известного специфического антигена (при серодиагностике заболеваний или для установления вида или рода выделенного микроба по его антигенной структуре с помощью диагностической сыворотки, содержащей известные видоспецифические или родоспецифические антитела).

2. Основные серологические реакции, используемые для идентификации микроорганизмов

2.1 Реакция агглютинации

Агглютинацией называется склеивание и выпадение в осадок микробных тел при взаимодействии их со специфическими антителами-агглютининами. Видимая фаза агглютинации наступает в присутствии раствора электролита (физиологического раствора хлористого натрия). агглютинины содержатся в сыворотке крови человека и животных, перенёсших инфекцию или искусственно иммунизированных соответствующим видом микроба или антигенами, выделенными из культуры этого вида микроорганизмов.

Благодаря специфичности и простоте постановки реакция агглютинации получила широкое распространение в микробиологической практике.

Существуют различные модификации постановки реакции агглютинации. Из них наибольшее значение имеют:

1. Макроскопическая объёмная агглютинация в пробирках (классический метод).
2. Ускоренная ориентировочная реакция агглютинации на стекле.

Методика постановки развёрнутой реакции агглютинации объёмным способом

Для постановки реакции агглютинации требуется:

1. Сыворотка крови, полученная от переболевших или многократно иммунизированных животных (морские свинки, кролики, бараны, лошади и др.).

2. Изотонический раствор хлорида натрия.
3. Корпускулярный антиген: взвесь живых или убитых бактерий.

Из сыворотки, с которой предполагается ставить реакцию агглютинации, готовят ряд последовательных двукратных разведений, чаще всего: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600. При постановке реакции агглютинации обязательно используют контроли: контроль сыворотки (1:100) и контроль антигена (суспензия микробов).

В пробирки с разведённой сывороткой (от 1:100 до 1:1600) за исключением пробирки с контролем сыворотки прибавляют по 2-3 капли суспензии микробных клеток с концентрацией 2×10^9 м.к./мл. после этого жидкость в пробирках становится слегка мутноватой. Пробирки встряхивают и помещают в термостат при температуре 37°C на 2 часа. После инкубирования учитывают предварительный результат реакции.

После просмотра пробирки в штативе оставляют при комнатной температуре на 18-20 часов и затем проводят окончательный учёт результатов.

Положительный результат реакции агглютинации характеризуется образованием на дне пробирки осадка с выраженным просветлением надосадочной жидкости. Осадок на дне пробирки, образовавшийся в результате склеивания микробов, называется агглютинатом. По характеру агглютината различают мелкозернистую (О) и крупнохлопчатую (Н) агглютинацию. О-агглютинины- это антитела возникшие в ответ на введение животным соматического О-антигена. В результате реакции агглютинации они формируют компактный мелкозернистый осадок, оседающий на дно пробирки в виде кучки. Мелкозернистая агглютинация протекает медленно и учитывается после 18-20 часового стояния при комнатной температуре.

Н-агглютинины вырабатываются в организме в ответ на введение жгутикового антигена. Они вызывают склеивание бактерий посредством их жгутиков с образованием крупных хлопьев, похожих на снежинки. Выпадая на дно пробирки, крупнохлопчатый агглютинат приобретает форму опрокинутого зонтика. Крупнохлопчатая агглютинация наступает и заканчивается в течение 2 часов при температуре 37°C .

Учёт результатов реакции агглютинации начинают с просмотра контрольных пробирок. Реакция может считаться положительной лишь в том случае, если в пробирках с контролями жидкость остаётся совершенно однородной: контроль с суспензией клеток-слегка мутной, контроль с сывороткой-прозрачной.

Для регистрации результатов реакции агглютинации используют четырёхкрестовую систему:

++++ - полная агглютинация, при которой осадок на дне располагается кучкой или в форме перевернутого зонтика. Надосадочная жидкость прозрачная.

+++ - почти полная агглютинация, осадок такой же, как и в предыдущем случае. Надосадочная жидкость почти прозрачная.

++ - слабая агглютинация. Небольшой осадок, надосадочная жидкость непрозрачная.

+ - следы агглютинации, осадок слабо заметен, надосадочная жидкость непрозрачная.

- - отрицательная реакция, содержимое пробирок по мутности не отличается от контрольной пробирки с суспензией клеток.

Последнее разведение сыворотки, в котором наблюдается агглютинация, считают её титром.

Определение серологического типа выделенного микроба

Серологическая идентификация микроба посредством агглютинации соответствующей специфической антисывороткой является завершающим этапом в изучении выделенных микробных культур.

Неизвестную культуру микроба изучают в реакции агглютинации с разведённой до титра иммунной диагностической сывороткой. За титр принимают конечное разведение антисыворотки, при котором происходит ещё отчётливая агглютинация соответствующего ей вида микроба. У коммерческих препаратов специфических антисывороток титр указывается на этикетке, наклеенной на ампуле.

Подготовка исследуемой культуры микроорганизмов

Из микробной культуры, выращенной на питательном агаре, готовят суспензию в изотоническом растворе хлорида натрия с концентрацией 2×10^9 м.к./мл по ОК.

При определении вида микроба пользуются набором диагностических агглютинирующих сывороток. Сыворотки выпускают в высушенном виде. На этикетках ампул указаны срок годности и титр сыворотки.

Ампулу вскрывают, содержимое разводят 1мл физиологического раствора хлорида натрия и готовят 3-4 основных разведений: 1:100, 1:1000, 1:10000 и 1:100000.

При проведении эксперимента в штатив устанавливают ряд агглютинационных пробирок (агглютинационные пробирки имеют коническую форму, объёмом 10-15мл), количество которых определяется титром антисыворотки. Например, если титр иммунной сыворотки 1:10000, то ставят 6 пробирок (4 пробирки с разными разведениями сыворотки и по

одной пробирке-контроль сыворотки без антигена, и антигена без сыворотки).

В каждую из 4 пробирок вносят по 0,5мл разных разведений сыворотки. В пятую пробирку (контрольную) внося 0,5мл сыворотки с минимальным разведением, а в шестую - суспензию микроорганизмов. Затем в 4 пробирки с разведённой сывороткой вносят по 0,5мл суспензии исследуемых микроорганизмов. В 5 и 6 пробирки вносят по 0,5мл физиологического раствора хлористого натрия. Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием и ставят в термостат на 2 часа при температуре 37⁰С. После чего производят предварительный учёт результатов. Окончательный результат регистрируют через 18-20 часов инкубирования при температуре 20⁰С.

Соответствие между видом и типом микроба и диагностической агглютинирующей сывороткой считается достоверным при условии чётко выраженной реакции агглютинации в пробирках с разведением сыворотки в пределах $\frac{3}{4}$ её титра.

Ориентировочная реакция агглютинации

Пластинчатой реакцией агглютинации часто пользуются для определения вида микроба. На поверхность хорошо обезжиренного предметного стекла наносят с помощью пастеровской пипетки 2 капли агглютинирующей сыворотки и 1 каплю физиологического раствора хлористого натрия. Капли располагают на некотором расстоянии друг от друга, чтобы исключить их слияние.

Затем в каплю изотонического раствора хлористого натрия и в одну из капель диагностической антисыворотки внося суспензию исследуемой культуры микроорганизмов. Для приготовления такой суспензии достаточно одной колонии, которую снимают с поверхности питательной среды и суспендируют в изотоническом растворе хлористого натрия.

Ко второй капле антисыворотки культуру не добавляют. Внесённую культуру тщательно перемешивают. Реакция агглютинации протекает при комнатной температуре в течение нескольких минут. Результат учитывают с помощью лупы. При положительной реакции в капле с сывороткой отмечается образование агрегатов или хлопьев, хорошо видимых при покачивании стекла. Жидкость в контрольных каплях с суспензией микроорганизмов остаётся равномерно мутной, а в капле сыворотки без микроорганизмов-прозрачной.

2.2 Реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации

В некоторых случаях антигены, используемые для реакции агглютинации, настолько высокодисперсны (очень мелкие молекулы), что комплекс агглютиноген-агглютинин не виден невооружённым глазом. Для того, чтобы эта реакция была хорошо видна, предложены методы адсорбции таких антигенов или специфических антител (в случае выявления антигенов в исследуемых пробах) на более крупных частицах-носителях с последующей их агглютинацией специфическими антителами или антигенами. В качестве адсорбентов-носителей используют эритроциты (лошади, барана, курицы), частицы латекса и др. Эта реакция получила название реакции непрямой или пассивной агглютинации. Положительный результат реакции проявляется видимой агглютинацией частиц носителя (эритроцитов, латексных частиц).

Наиболее высокой адсорбционной способностью обладают эритроциты. Эритроциты обычно заготавливают впрок, обрабатывая формалином или глутаральдегидом. Для сенсibilизации эритроцитов (латексных частиц) используют моновалентные сыворотки, полученные после сорбции всех других антител, кроме специфических к определённым антигенам микроорганизмов. Такие сыворотки получают из поливалентных антисывороток, которые забирают у переболевших животных (людей) или вакцинированных корпускулярными антигенными препаратами. Наиболее специфичные диагностикумы получают при использовании моноклональных антител, наработанных с использованием гибридомных технологий.

Реакцию пассивной гемагглютинации ставят в специальных планшетах, имеющих U-образные лунки объёмом $1,5-2,0\text{см}^3$, или в микропланшетах с помощью микротитратора Такачи. В первом случае объём исследуемой пробы (суспензии микроорганизмов) должен быть не менее $2-3\text{см}^3$, во втором случае $0,3-0,5\text{см}^3$.

При постановке РПГА суспензию исследуемого микроорганизма двукратным шагом титруют на два ряда в планшетах. Первое разведение, как правило, должно быть 1:10 или 1:20. Затем в верхний ряд закапывают по 1 капле диагностических эритроцитов, сенсibilизированных иммуноглобулинами, а в нижний ряд закапывают контрольные эритроциты, не содержащие на своей поверхности иммуноглобулинов (просто тонизированные). Планшет встряхивают и оставляют на 2 часа при комнатной температуре.

Результаты реакции учитывают по наличию гемагглютинации-рыхлого осадка из склеившихся эритроцитов на дне и боковых поверхностях лунок (образуются «зонтики»). В контрольных лунках агглютинации быть не должно-отмечается появление плотного осадка эритроцитов в виде пуговки

или колечка. Титр определяемого в суспензии микробных клеток антигена определяют величиной, обратной разведению суспензии (например, 1:1280 или 1:2560) в лунке с положительной реакцией агглютинации.

2.3 Реакция связывания комплемента (РСК)

Реакция связывания комплемента (РСК) относится к сложным серологическим реакциям. Для её проведения необходимы 5 ингредиентов, а именно: антиген (суспензия исследуемых микроорганизмов), антисыворотка (моноклональная) и комплемент (первая система). Эритроциты барана и гемолитическая сыворотка, содержащая специфические антитела к эритроцитам барана (вторая система). Специфическое взаимодействие антигенов микробной клетки и антител сопровождается связыванием комплемента. Поскольку этот процесс (связывание комплемента) не проявляется визуально, Жорж Борде и Онри Жангу предложили использовать в качестве индикатора гемолитическую систему (эритроциты барана-гемолитическая антисыворотка), которая показывает, фиксирован ли комплемент комплексом АГ-АТ. Если антиген исследуемой культуры микроорганизмов гомологичен антителам иммунной сыворотки, т.е. образовался иммунный комплекс, то комплемент связывается этим комплексом. При внесении в пробирку второй системы (эритроциты барана и гемолитической сыворотки) гемолиза эритроцитов не происходит, поскольку в реакционной смеси отсутствует комплемент. Если антиген микробных клеток не гомологичен антителам иммунной сыворотки, комплемент не связывается и при добавлении второй системы происходит гемолиз эритроцитов барана.

РСК обладает относительно высокой чувствительностью и специфичностью, поэтому её применяют при идентификации микроорганизмов, особенно при диагностике инфекционных заболеваний.

2.4 Серологические реакции с использованием метки

В настоящее время при видовой идентификации микроорганизмов широко применяют серологические реакции, в которых участвуют меченные тем или иным способом антитела. Серологические реакции с использованием метки позволяют быстро получить результаты, как правило, отличаются высокой чувствительностью и находят широкое применение при идентификации возбудителей инфекционных заболеваний.

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) основана на использовании флюоресцеинизотиоцианата (ФИТЦ) или других флюорохромов, химически связанных (конъюгированных) с антителами. При этом меченные антитела (в

составе иммунофлюоресцирующих антисывороток) сохраняют иммунологическую специфичность и вступают во взаимодействие со строго определёнными (специфическими) антигенами поверхностных структур микробных клеток. Комплексы антигенов с мечеными антителами легко определяются по жёлто-зелёному свечению при изучении препарата под люминисцентным микроскопом.

Для приготовления препаратов для микроскопии на хорошо обезжиренном предметном стекле делают мазок из суспензии микробных клеток. Мазок подсушивают, фиксируют над пламенем спиртовки или в метиловом спирте, а затем окрашивают раствором антител, меченных ФИТЦ, в течение нескольких минут. После этого мазок хорошо промывают водой, подсушивают и исследуют под люминисцентным микроскопом. Если антитела в диагностикуме гомологичны какому-либо из поверхностных антигенов микробных клеток, то под микроскопом при большом увеличении с иммерсией видны микробные клетки, окружённые светящимися жёлто-зелёными точками (частицами).

2.5 Иммуноферментный анализ (ИФА)

Метод основан на использовании в качестве метки антител ферментов, способных разлагать субстрат и приводить к образованию окрашенных продуктов (хромогена). Конъюгированные с ферментом антитела сохраняют способность соединяться с гомологичным антигеном. Интенсивность окраски хромогена соответствует количеству образовавшихся комплексов АГ+АТ-фермент.

В качестве ферментов чаще всего используют пероксидазу и щелочную фосфатазу. Субстратом для пероксидазы является перекись водорода, а хромогеном служит 5-аминосалициловая кислота, ортофенилендиамин и другие вещества.

В настоящее время в микробиологии чаще всего используют твёрдофазную модификацию ИФА. Её суть заключается в том, что на поверхности лунок в 96-луночных Ц-планшетах сенсibiliзируют иммуноглобулинами (специфическими антителами). Затем, чтобы закрыть оставшуюся незакрытой антителами поверхность лунок, их обрабатывают белком-альбумином. Это позволяет в последующем избежать неспецифического связывания с поверхностью лунок молекул исследуемого антигена. Приготовленные таким образом планшеты высушивают и хранят в закрытом виде в холодильнике при температуре ниже 0⁰С в течение нескольких месяцев.

Определение неизвестных антигенов (поверхностных антигенов идентифицируемых микробных культур) осуществляют следующим образом.

В сенсibilизированный специфическими иммуноглобулинами (антителами) планшет вносят раствор (или суспензию) исследуемого антигена. В случае гомологичности антиген (микробные клетки) связываются с иммобилизованными на стенках лунок антителами. После инкубации планшет промывают и все не связавшиеся с антителами молекулы антигена (микробные клетки) удаляют.

На следующем этапе в планшет вносят раствор антител, гомологичных исследуемому антигену. Антитела связываются с уже сорбированном на молекулах иммуноглобулинов антигеном. После инкубирования планшет вновь промывают для удаления не связавшихся антител. (Чаще всего уже на этом этапе используют антитела, конъюгированные с молекулой фермента. В этом случае не требуется использовать антивидовые антисыворотки и постановка реакции сокращается на один этап. Хромогенный субстрат добавляют уже после этого этапа и учитывают результат реакции).

Затем в лунки планшета вносят раствор антивидовых антител (если на предыдущем этапе были использованы мышинные антитела, то вносят антимышиную сыворотку, если кроличьи-то антикроличью сыворотку). Антивидовые антитела конъюгированы с ферментом (пероксидазой или щелочной фосфатазой). Если на предыдущем этапе антитела адсорбировались на комплексах АГ-АТ, то антивидовые антитела конъюгируются с антителами. Лунки планшета вновь промывают от излишков антивидовых антител с ферментом.

На заключительном этапе в лунки планшета вносят раствор хромогенного субстрата (5-аминосалициловая кислота или ортофенилендиамин) который под действием фермента расщепляется и изменяет окраску. По интенсивности изменения окраски учитывают результат анализа (с помощью прибора «Rider»).

2.6 Иммуноблотинг

В основе этого метода лежит твёрдофазный вариант ИФА для обнаружения неизвестных антител или для выявления неизвестных антигенов (например, токсинов) в культурах исследуемых микроорганизмов.

При постановке иммуноблотинга вначале лизат культуры неизвестного микроорганизма фракционируют-разделяют методом электрофореза в агарозном геле на фракции (отдельные антигены). Из-за разной подвижности в градиенте электрического поля отдельные антигенные молекулы разделяются по электрофоретической подвижности на отдельные группы

(образуют полосы). После этого гель накладывают на нитроцеллюлозную мембрану, плотно прижимают к ней так, чтобы не было пузырьков воздуха, и создают электрическое поле. В результате этого происходит перенос антигенных фракций на мембрану (блоттинг). При этом сохраняется взаиморасположение отдельных антигенных фракций. Далее обработку фильтра ведут также, как при постановке ИФА-с использованием антисывороток, конъюгированных с ферментом. В частности для выявления экзотоксинов используют специфические антитоксические сыворотки, конъюгированные с пероксидазой хрена. После промывки нитроцеллюлозной мембраны её обрабатывают хромогенным субстратом (5-аминосалициловой кислотой). В результате взаимодействия фермента с субстратом происходит окрашивание той полосы на нитроцеллюлозной мембране, где сосредоточены молекулы искомого токсина или другого антигена. Иногда в качестве метки для антиглобулиновой сыворотки применяют не ферменты, а радиоактивные изотопы.

2.7 Получение моноклональных антител путём слияния клеток (гибридомная технология)

Количество возможных вариантов антител у млекопитающих очень велико, оно составляет приблизительно 10^7 . К одной детерминанте может образовываться до 8×10^3 вариантов молекул антител. В условиях обычного иммунного ответа из всего видового потенциала антител у конкретного индивида образуется небольшое количество типов антител, представляющих собой случайную выборку из числа всех возможных вариантов. В связи с этим невозможно получить антисыворотки от различных индивидов, обладающие одинаковым набором антител. В случае сложных антигенов иммунный ответ наблюдается в отношении приблизительно ста поверхностных антигенов, каждый из которых обладает несколькими детерминантами. Учитывая случайный выбор вариантов антител к каждой отдельной детерминанте, становится понятным, что антисыворотки от двух разных особей могут сильно отличаться между собой. Невозможность воспроизвести на другом животном набор антител, получаемых от какого-либо определённого животного, сильно осложняет процесс стандартизации сывороток, для получения сывороток против отдельных детерминант антигенов приходится использовать трудоёмкие и длительные по времени методы адсорбции, что часто приводит к выделению антисывороток с очень низким титром антител.

Эти недостатки можно устранить, применяя моноклональные антитела к определённым антигенным детерминантам (эпитопам). Моноклональные антитела продуцируются постоянно культивируемыми линиями клеток.

В 1975 году Кёллер и Мильштейн впервые добились слияния короткоживущих лимфоцитов (В-лимфоцитов), продуцирующих антитела, и постоянно растущих клеток плазмоцитомы (раковых клеток). Это открытие дало возможность получать теоретически «бессмертные», непрерывно культивируемые клоны гибридных клеток-продуцентов антител (гибридомы). Образованные гибридами моноклональные антитела имеют сходное молекулярное строение и обладают одинаковой специфичностью. Первоначально слияние лимфоцитов, продуцирующих антитела, и плазмоцитом (культура перевиваемых раковых клеток) проводили с помощью вируса Сендай. В последующем для этих целей начали применять полиэтиленгликоль (ПЭГ). Применение ПЭГ в качестве агента, стимулирующего процесс слияния клеток, позволило существенно увеличить частоту слияний. Неслившиеся лимфоциты отмирают через несколько дней после гибридизации. Отделение неслившихся плазмоцитомных клеток от гибридом возможно только при использовании питательной среды ГАТ (среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин). Предпосылкой для ГАТ-зависимой селекции является наличие вариантов (мутантов) плазмоцитарных клеток, дефектных по гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе (ГГФРТ) или по тимидинкиназе (ТК). (ГГФРТ и ТК-это ферменты, участвующие в синтезе нуклеотидов, которые используются для построения ДНК). Эти клетки отмирают в культуральной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ГАТ), поскольку не обладают способностью обойти аминоптериновый блок основного пути биосинтеза ДНК за счёт биосинтеза гипоксантина и тимидина. Только гибридные клетки, полученные слиянием ГГФРТ-негативных или ТК-негативных плазмоцитомных клеток и нормальных лимфоцитов (ГГФРТ и ТК-позитивных), выживают в среде с гипоксантином, аминоптерином и тимидином (ГАТ-среда), преодолевая аминоптериновый блок.

Линии плазмоцитом, дефектные по гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе (ГГФРТ) получают путём селекции клеток, резистентных к 8-азагуанину. Линии плазмоцитом, дефектные по тимидинкиназе (ТК), выделяют по резистентности к 5-бромдезоксимуридину. Среди растущих на среде ГАТ гибридом выделяют и селекционируют те клоны, которые продуцируют иммуноглобулины нужного класса и определённой специфичности.

Полученные антителопродуцирующие клоны гибридом можно культивировать *in vivo* и *in vitro*. В зависимости от этого моноклональные антитела получают из асцитической жидкости или из надосадочной фракции культуральной среды.

Тема №7

«Использование молекулярно-генетических методов при видовой идентификации микроорганизмов»

Вопросы:

1. Методы генетического анализа, используемые для идентификации микроорганизмов
2. Определение плазмидного состава (скрининг плазмид) для типирования микроорганизмов
3. Использование рестрикционного анализа для типирования микроорганизмов
4. Использование результатов генетического зондирования для видовой идентификации микроорганизмов.
5. Риботипирование
6. Использование микрочипов для видовой идентификации микроорганизмов

1. Методы генетического анализа, используемые для идентификации микроорганизмов

Большинство существующих методов индикации, идентификации, дифференциации микроорганизмов, основано на определении фенотипических свойств.

Нестабильность фенотипа вносит элемент неопределённости в получаемые результаты. Это обусловило необходимость разработки приёмов идентификации и типирования микроорганизмов, основанных на анализе структуры генома, как более стабильной системы.

Базисом для создания методов, позволяющих регистрировать особенности организации геномов микроорганизмов явились исследования 1970-80-х годов в области молекулярной генетики.

ДНК-это макромолекула, которая при кислотном гидролизе расщепляется на свои структурные элементы: дезоксирибозу, фосфорную кислоту и азотистые основания (аденин и гуанин - пуриновые основания; цитозин и тимин - пиримидиновые основания) Из них состоят дезоксирибонуклеотиды, которые соединены в нуклеиновых кислотах в длинные цепи- полинуклеотиды.

Генотип - совокупность структурных форм (аллелей) всех генов клетки.

Фенотип - совокупность внешних признаков организма, которые формируются в процессе взаимодействия генотипа и окружающей среды.

Мутации — любое изменение в последовательности нуклеотидов молекулы ДНК.

Полинуклеотид: цепи закручены в двойную спираль вокруг воображаемой оси, цепи скреплены водородными связями, соединяющими основания, которые обращены внутрь спирали. При этом А-Т (аденин-тимин), Г-Ц (гуанин-цитозин) (строго). Прочность этих связей сравнительно низкая. Из-за малой энергии связи такие воздействия, как повышение температуры, изменение в растворе концентраций ионов магния или добавление в раствор ДНК мочевины могут приводить к разрушению этих связей.

При повышении температуры происходит разрыв водородных связей и расхождение полинуклеотидных цепей -плавление ДНК. При этом точка плавления ДНК (T_m) тем выше, чем больше в ДНК гуанина и цитозина, которые соединены между собой тремя водородными связями.

По содержанию гуанина и цитозина бактерии сильно отличаются между собой. Содержание Г-Ц пар у разных видов микроорганизмов колеблется от 30% до 70%. Содержание Г-Ц пар у разных видов микроорганизмов высоко специфично и является таксономическим признаком (определяют по температуре плавления ДНК).

Создание диагностических средств на основе анализа ДНК и РНК биологических объектов, определяющих индивидуальность любого организма, в последние годы развивается наиболее бурно. Эти средства объединяются термином ДНК-тест-системы. Почти все они основаны на принципе комплементарности оснований нуклеотидов в двух противоположных (комплементарных) цепях ДНК-ДНК, ДНК-РНК, или РНК-РНК. Среди методов анализа ДНК на первом месте стоит ПЦР.

Методы молекулярно-генетического типирования микроорганизмов:

1. Определение плазмидного состава (скрининг плазмид);
2. Рестрикционный анализ (выявление полиморфизма длин рестрикционных фрагментов);
3. Генетическое зондирование (детекция при помощи молекулярных зондов, риботипирование, IS-типирование);
4. Геномная «дактилоскопия» (фингерпринтинг на основе генетического зондирования);

5. Риботипирование;
6. Вычитающий рестрикционный фингерпринтинг;
7. ПЦР-детекция и ПЦР-фингерпринтинг;
8. Тестирование локусов, содержащих короткие вариабельные повторяющиеся последовательности (VNTR-анализ);
9. Лигазная цепная реакция (ЛЦР).

2. Определение плазмидного состава (скрининг плазмид) для типирования микроорганизмов

Плазида - кольцевая внехромосомная ДНК, способная к автономной репликации.

Метод идентификации микроорганизмов по плазмидному составу заключается в выделении из культуры бактерий внехромосомной ДНК, проведение электрофореза в агарозном геле и выявление внехромосомных элементов наследственности (плазмид) по наличию флуоресцирующих в УФ-свете молекул ДНК.

Экспериментальная схема анализа заключается в следующем:

лизис микробных клеток, выделение внехромосомной ДНК, электрофорез полученных препаратов плазмидной ДНК (основан на способности макромолекул ДНК перемещаться под действием электрического поля в геле); детекция при УФ-облучении, окрашенных бромистым этидием гелевых пластинок.

3. Использование рестрикционного анализа для типирования микроорганизмов

Рестриктазы- это ферменты (эндонуклеазы), узнающие специфические нуклеотидные последовательности и расщепляющие ДНК на отдельные фрагменты разной величины. В основе рестрикционного анализа лежит реакция взаимодействия эндонуклеаз с ДНК, в результате которой образуются фрагменты (рестрикты) разной длины, которые по размеру специфичны и характерны для ДНК, выделенной из разных микроорганизмов, что даёт возможность проводить анализ структуры геномов, и типировать микроорганизмы. Рестрикты разделяют по размерам путём геля электрофореза. Картина их распределения служит основой для идентификации бактерий. Рестрикционный анализ может быть использован для анализа как хромосомы так и внехромосомных ДНК.

Плазмиды из разных штаммов могут иметь различную молекулярную массу, но даже при одинаковой массе профиль их рестрикции неодинаков.

Если для рестрикционного анализа используется хромосома микроорганизмов, то этот метод называют как «метод ПДРФ» (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Картина расщепления ДНК на электрофоретической пластинке может быть разной даже у штаммов одного вида бактерий, если мутация произошла в сайте рестрикции, что привело к изменению длины рестрицированного фрагмента ДНК и соответственно рестрикционной картины при электрофорезе.

Ограничения метода: сложности, возникающие при подборе рестриктаз, поскольку должны использоваться крупнощепящие рестриктазы. Очень часто на электрофореграмме проявляется очень много полос, что сильно затрудняет интерпретацию результатов.

4. Использование результатов генетического зондирования для видовой идентификации микроорганизмов.

Метод ДНК-зондирования так же основан на различиях нуклеотидных последовательностей ДНК у разных видов микроорганизмов.

ДНК зонды это диагностические препараты, используемые для детекции, идентификации, типирования разных видов микроорганизмов путем молекулярной гибридизации.

ДНК-зонды бывают родо-, видо-, штаммо-специфическими – всё зависит от выбранных генов-мишеней

ДНК-зонды различаются по количеству нуклеотидов: полинуклеотидные (длинные) и олигонуклеотидные (короткие).

Преимущество олигонуклеотидных зондов - небольшая длина, что позволяет сократить продолжительность гибридизации. Но чувствительность анализа при использовании таких зондов низкая, так как степень мечения пропорциональна длине гибридизующегося участка; кроме того, надо знать первичную структуру детектируемого гена (эту информацию находят в банке генов конкретного микроорганизма).

В ходе реакции молекулярной гибридизации зонд образует с участком ДНК исследуемого микроорганизма (также находящимся в однонитевой форме) гибридную двунитевую молекулу. Специфичность реакции обусловлена тем, что двунитевые комплексы образуются молекулами, которые имеют большую гомологию (подобие) нуклеотидных последовательностей

Три стадии проведения анализа: денатурация ДНК, ренатурация в присутствии меченого зонда, детекция метки.

Основные стадии метода ДНК-гибридизации (генетического зондирования):

Денатурация - переход молекул ДНК (или РНК) из двуцепочечной формы в одноцепочечную вследствие нарушения водородных связей между полинуклеотидными цепями и стэкинг-взаимодействий.

Ренатурация - реассоциация денатурированных комплементарных цепей ДНК с образованием двухцепочечной молекулы.

Гетеродуплекс - (гибрид) - молекула ДНК, образованная при спаривании одноцепочечных комплементарных ДНК из различных родительских дуплексов.

Основные варианты проведения реакции гибридизации:

1. Дот-анализ на твердой подложке (чаще всего применяется для обнаружения патогенных видов микроорганизмов);
2. В растворе (реакция протекает в 5-10 раз быстрее, но требует последующего отделения гибридных молекул);
3. Блот-гибридизация (применяется для идентификации бактерий, но требует очищенной ДНК и непригодна для экспресс диагностики).

Характеристики метода генетического зондирования:

1. Высокая специфичность, позволяющая идентифицировать бактерии в чистых и смешанных культурах, в образцах из окружающей среды и в биологическом материале.
2. Возможность проведения анализа нескольких проб одновременно.
3. Возможность выявления как экспрессирующихся, так «молчащих» генов.
4. Возможность идентификации бактерий, проявляющих антигенную вариабельность.
5. Возможность идентификации трудно культивируемых, нежизнеспособных или высушенных бактерий.
6. Экспрессность и высокая чувствительность анализа (продолжительность анализа 6-8 часов, чувствительность- 10^{3-6} микробных клеток в 1 мл).

Несмотря на все перечисленные достоинства, ДНК-зондирование не так широко распространено в микробиологической практике. Причина: для регистрации результатов реакции гибридизации используют радиоактивное излучение прикрепленной к зонду изотопной метки. Радиоизотопный метод детекции чувствителен; этот процесс не зависит температуры, рН, ионной силы раствора. Но работа с изотопами потенциально опасна для здоровья и может проводиться только в специально оборудованных,

сертифицированных для работы с радиоактивными веществами, лабораториях. Разработаны нерадиоактивные методы с использованием флюоресцентных красителей. Результат реакции проявляется в виде цветного пятна на фильтре. К сожалению, нерадиоактивные способы детекции значительно менее чувствительны, чем радиоизотопный. Кроме того, они дают высокий фон, затрудняющий выявление специфических результатов реакции. Кроме того, наборы реагентов для проведения этих анализов имеют высокую стоимость.

Тем не менее, этот метод достаточно часто используется в лабораториях и в настоящее время существуют несколько фирм, выпускающих коммерческие наборы для идентификации возбудителей инфекционных заболеваний.

5.Риботипирование

Метод успешно используется для изучения генетического родства штаммов микроорганизмов, их возможного происхождения и определения путей заноса инфекции. Метод основан на полиморфизме длин рестрикционных фрагментов ДНК, кодирующей рибосомальную РНК, может быть использован для видовой и подвидовой идентификации.

6. Использование микрочипов для видовой идентификации микроорганизмов

Принципы генетического зондирования используются при создании микрочипов. Преимущества использования технологии микрочипов для видовой идентификации микроорганизмов следующие:

1. Реакция гибридизации может происходить между двумя комплементарными нитями ДНК как в растворе, так и между комплементарными молекулами, иммобилизованными на твёрдой подложке.

2. Технология микрочипов упрощает процедуру идентификации микроорганизмов и предоставляет новые возможности для выявления специфических генетических локусов при идентификации микроорганизмов, возможна автоматизация процесса идентификации.

Конструктивно биочипы делятся на две группы:

1. Матричные чипы, представляющие собой микропластинку, размером 1 - 2 см², с дискретно иммобилизованными в ячейках с большой плотностью молекулярными зондами, способными избирательно связывать те или иные вещества, присутствующие в анализируемых образцах.

2. Капиллярные чипы - миниатюрная система для разделения сложных смесей различных соединений физико-химическими методами, такими как хроматография или электрофорез, часто совмещенная с миниатюрной ячейкой для проведения ПЦР или других химических реакций ("лаборатория-на-чипе").

В **матричных биочипах** в качестве зондов могут быть использованы любые молекулы, способные образовывать специфические комплексы: фрагменты нуклеиновых кислот, антитела, клеточные рецепторы, ферменты и даже некоторые виды олигосахаридов.

Для гибридационного анализа с помощью чипа используется предварительно меченая ДНК-мишень. Теоретически метка может быть любой, но все коммерчески доступные в настоящее время детектирующие устройства ("чип-ридеры") используют различные типы флуоресцентных меток. Гибридационные ДНК-чипы различаются по размеру иммобилизованных фрагментов ДНК, по методам иммобилизации молекул (привязки к подложке микрочипа), по способам гибридизации и детекции сигнала.

В России технология гибридационных чипов развивается с 1988 г. в Центре биологических микрочипов на базе Института молекулярной биологии им. Энгельгардта под руководством академика Мирзабекова (умер). Разработаны высокоплотные ДНК-чипы на основе миниатюрных полиакриламидных гелей с максимальным размером до 1мм^3 . В этом институте разработано несколько чипов для анализа генов человека, чип для типирования и определения антибиотикоустойчивости у возбудителя туберкулеза, чип для идентификации возбудителя сибирской язвы и чип для идентификации вируса натуральной оспы.

Имеется информация о создании биочипа для идентификации 14 вирусных возбудителей менингита.

Капиллярный микрочип представляет собой пластинку, размером 2 - 5 см^2 , из химически инертного материала (стекло, силикон, кварц, пластик и др.), в которой вытравлены пересекающиеся микрокапиллярные каналы и камеры самой различной топологии и в различном количестве с минимальным общим объемом порядка 50мкл. Работа на капиллярных чипах предполагает использование широкого спектра современных достижений микротехники - микронасосов для подачи и продвижения проб и реагентов по капиллярам (в объеме 1 пиколитр), микротермодатчиков и микронагревателей для термостатирования пробы, микроэлектродов для проведения электрофореза и т.п. Капиллярный биочип в использовании принципиально проще, чем матричный. Такой чип, разработанный фирмой

Serheid (США) может применяться в полевых условиях неквалифицированным персоналом, давая результат через 30 мин. В общем устройство капиллярного чипа определяется конкретными целями, для которых данный чип создается

Оригинальный 96-канальный капиллярный микрочип с радиально расположенными каналами для анализа ПЦР-продуктов с помощью электрофореза разработан в научном центре Berkley. До недавнего времени это был самый "многоканальный" чип, но уже сейчас технические возможности позволяют создать чип на тысячу и более каналов. Фирмой Oak Ridge (США) разработан 4-х канальный микрочип, позволяющий автоматически выделять ДНК из бактериальных клеток, амплифицировать их и анализировать длину ПЦР-продуктов. На настоящий момент реальными заказчиками таких систем являются фармацевтические компании. При поиске новых лекарственных препаратов такая система может заменить целую химическую лабораторию, существенно (более, чем на три порядка) сократить количество реактивов и времени.

Многие фирмы, производящие ДНК-чипы также заявляют о создании «иммуночипов». Преимущества таких систем перед обычными наборами для иммунодиагностики связаны с возможностью параллельного определения в анализируемом препарате нескольких антигенов, со значительным сокращением времени анализа, снижением лабораторных трудозатрат. Перспективы использования иммуночипов очевидны. В частности, для типирования вируса гепатита С. Различие вирусной РНК HCV (возбудителя гепатита С), получаемой из разных источников, может достигать 40 %, что затрудняет использование отдельных олигонуклеотидных зондов (праймеров) для диагностики. Перспективным является создание биочипа, содержащего 5 - 20 наиболее существенных иммунологических детерминант вирусов гепатита С тех типов, которые распространены на территории РФ, что позволит сконструировать универсальный биочип, пригодный не только для выявления вируса в пробе, но и его типирования и мониторинга развития иммунного ответа, что может иметь важное значение для прогноза болезни и выбора тактики лечения.

Геномная дактилоскопия (фингерпринтинг)

Метод основан на выявлении в генетическом материале человека, животных, растений и микроорганизмов уникальных по структуре участков ДНК, характерных для данного индивидуума. Некоторые участки нуклеотидных последовательностей, разбросанные вдоль молекулы ДНК, повторяются у каждого микроорганизма в различной последовательности и в

разных сочетаниях. Эти участки, выявляются молекулярной гибридизацией с помощью зондов.

Сущность метода заключается в обнаружении геномного полиморфизма с помощью—рестрикционного анализа и последующей гибридизации со специфическими зондами. Количество и расположение фрагментов различных генов на образовавшихся рестриктах, реагирующих с ДНК-зондом, индивидуально.

Вариабельные тандемные повторы (VNTR - variable number of tandem repeats) представляют собой участки ДНК, содержащие последовательно расположенные и монотонно повторяющиеся нуклеотидные сайты. Использование дегенеративных тандемных повторов (на участках ДНК, непосредственно не связанных с функционально активными генами) значительно расширяет возможности совершенствования эпидемиологического надзора. Было проведено сравнительное изучение геномов 80 штаммов возбудителя холеры серотипа Эльтор, выделенных в очаге холеры в Казани, с помощью VNTR- анализа и однопраймерной ПЦР (двумя методами). По результатам анализа состояния аллелей пяти VNTR- локусов сделано заключение о едином источнике вспышки. Полученные в однопраймерной ПЦР профили полиморфных фрагментов ДНК подтвердили сделанное заключение.

VNTR-последовательности проявляют высокую степень полиморфизма; именно их гипервариабельность используется в дактилоскопии. Характерной особенностью VNTR-последовательностей является разная локализация и разное число повторов, которые отличаются у особей данного вида (разных штаммов одного вида бактерий) и являются их уникальными генетическими характеристиками. VNTR-анализ, основанный на оценке вариабельности числа тандемных повторов, обладает максимальным дискриминационным потенциалом и хорошей воспроизводимостью.

Гибридизационная картина, создаваемая суммой гипервариабельных локусов, чрезвычайно полиморфна, так как является комбинацией множества (нескольких десятков) независимых полиморфных элементов. Таким образом, для каждого микроорганизма существует "дактилоскопический отпечаток" генома.

Вычитающий рестрикционный ФИНГЕРПРИНТИНГ.

Метод вычитающего рестрикционного фингерпринтинга- это новый подход в молекулярном типировании, характеризующийся лёгкостью исполнения, высокой воспроизводимостью, универсальностью в применении,

имеющий высокую разрешающую способность и не требующий дорогого оборудования.

Данный метод разработан на модели *E.coli* и *Salmonella enterica*. Метод позволяет распознать изоляты и субклоны, дифференцировать как разные штаммы бактерий внутри вида, так и близкородственные виды.

Принцип метода:

метод основан на обработке геномной ДНК двумя ферментами рестрикции, последующим мечением концов фрагментов ДНК (рестриктов) нерадиоактивными метками (биотином), избирательным захватом и удалением биотин меченных фрагментов ДНК стрептавидин-магнитными частицами.

Оставшиеся в супернатанте фрагменты после этапа связывания с магнитными частицами, далее разделяют электрофорезом в агарозном геле, переносят на нейлоновую мембрану, детектируют иммунохимическим методом - антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой (принцип ИФА).

Преимущества данного метода:

- 1) метод требует меньше энзиматических шагов, чем анализ полиморфизма длины амплифицируемых фрагментов;
- 2) не требует специальной подготовки ДНК, как для пульс-электрофореза;
- 3) имеет высокую воспроизводимость;
- 4) позволяет использовать не только агарозные гели, но и высокоразрешающий полиакриламидный гель.

Метод мультилокусного секвенирования-типирования.

Метод предложен в 1998 году. Включает в себя секвенирование определённых фрагментов генома, обозначение аллелей согласно разработанной номенклатуре (каждая уникальная последовательность имеет свой номер) и объединение номеров по нескольким локусам в аллельный профиль. Генетическая характеристика штаммов проводится на основании анализа аллельных профилей с помощью компьютерного обеспечения. Метод используется для получения генетической характеристики разных штаммов микроорганизмов. Позволяет описать генетическое разнообразие и клональную структуру бактериальной популяции и эволюционный потенциал отдельного вида микроорганизмов.

Тема: №8

«Виды ПЦР-анализа, используемые для выявления и идентификации микроорганизмов. Основные принципы постановки ПЦР-анализа в «классическом» формате, «горячий старт», «Real time PCR»

Вопросы:

1. Принцип метода полимеразной цепной реакции, модификации этого метода
2. Генодиагностические тест-системы нового поколения
3. Биочипы

1. Принцип метода полимеразной цепной реакции, модификации этого метода

В 1993 году автор метода ПЦР-анализа Кэрри Мюллис был удостоен Нобелевской премии. Основой метода, названного полимеразной цепной реакцией, является использование ДНК-полимеразы для синтеза новых копий нуклеотидной последовательности ДНК, фланкируемой специфичными праймерами.

ПЦР - осуществляемая *in vitro* специфическая амплификация коротких нуклеотидных последовательностей, иницируемая синтетическими олигонуклеотидными праймерами.

Среди всех биологических методов лишь ПЦР и ЛЦР (лигазная цепная реакция) обладают максимальной чувствительностью и специфичностью. При этом ПЦР весьма проста в исполнении, что определило повсеместное распространение этой методики всего за несколько лет после её изобретения.

В основе реакции лежит способность узнавания комплементарными цепями ДНК друг друга.

Амплификаты ДНК становятся доступными для выявления достоверными методами, например, гель-электрофорезом с последующей окраской бромистым этидием или другими флюоресцентными красителями на основе оксазола, которые повышают чувствительность при окраске более чем в 10 раз и имеют меньшую фоновую светимость (по сравнению с бромистым этидием).

Возможности применения метода весьма обширны: идентификация личности, анализ качества воды, продуктов питания, пренатальная диагностика наследственных заболеваний, в иммунологии, для определения совместимости тканей, в онкологии, в диагностике и мониторинге

инфекционных заболеваний. Широкое применение метода нашло в исследованиях при идентификации разных видов микроорганизмов.

Место ПЦР-анализа при идентификации разных видов микроорганизмов:

1. Идентификация трудно культивируемых видов микроорганизмов (микобактерии туберкулёза, хламидии и др.).

2. При идентификации возбудителей вирусных инфекций (возбудители вирусных гепатитов В, С и др.).

3. Индикация (ускоренная диагностика) и идентификация возбудителей особо опасных инфекций (возбудители чумы, сибирской язвы, бруцеллёза, туляремии и др.).

4. Определение эпидемиологических маркеров для оценки эпидзначимости и типирования штаммов патогенных микроорганизмов.

5. Определение генов, детерминирующих лекарственную устойчивость микроорганизмов.

Основные преимущества метода ПЦР при идентификации микроорганизмов, перед другими методами исследований:

1. Высокая чувствительность ПЦР-анализа-100-1000м.к./мл.

2. Высокая специфичность - определяется уникальностью выявляемого участка генома и достигает 100%

3. Экспрессность метода - время выполнения анализа от момента получения материала до выдачи документированного ответа составляет - 4-8 часов.

4. Видовая идентификация микроорганизмов возможна в любом биологическом материале, полученном из разных объектов окружающей среды.

5. Метод ПЦР позволяет идентифицировать фенотипически изменённые варианты разных видов микроорганизмов.

6. Для проведения ПЦР-анализа не требуется этапа подращивания исследуемой культуры микроорганизмов.

7. Позволяет осуществлять идентификацию одновременно по нескольким генам (ДНК-мишеням), что существенно повышает достоверность результатов идентификации.

В настоящее время совершенствование метода ПЦР наиболее интенсивно происходит в двух направлениях:

1, Детекция микроорганизмов, то есть, обнаружение разных видов микроорганизмов, в том числе и возбудителей инфекционных заболеваний

бактериальной и вирусной природы, в окружающей среде и в биологических материалах с помощью ПЦР со специфическими праймерами.

2. Типирование микроорганизмов (идентификация), то есть, получение специфических картин распределения ампликонов на электрофореграммах (паттерны) с использованием специфических и произвольных (универсальных) праймеров, которые обнаруживают консервативные области и переменные участки генома.

Описание метода:

ПЦР - высокоэффективный способ идентификации разных видов микроорганизмов, позволяющий в течение 4-6 часов получить результат анализа. Реакция чувствительна и специфична. Видоспецифические генетические маркеры микроорганизмов могут быть выявлены непосредственно в образце, взятом из объектов окружающей среды, что позволяет идентифицировать микроорганизмы минуя этапы получения накопительных и чистых культур.

ПЦР-цикл состоит из тепловой денатурации ДНК (1 этап), ее отжига с праймером (2 этап), и удлинения цепи-элонгации (3 этап). Смена этих этапов происходит в результате изменения температуры реакционной смеси в пробирке.

Сущность метода состоит в одновременном копировании *in vitro* двух комплементарных цепей ДНК. Праймеры служат для определения концов нуклеотидной последовательности, которая будет копироваться.

Анализ выполняется в малом объеме реакционной смеси – от 20 до 100 мкл. Если объем реакционной смеси меньше, то снижается точность анализа, если больше – то увеличивается расход дорогостоящих реактивов без изменения чувствительности и специфичности анализа.

Химизм процесса полимеразной цепной реакции состоит в следующем:

1. Сначала молекула ДНК разделяется на две нити при нагревании до температуры 94-95⁰С (денатурация).

2. Затем в раствор добавляют праймеры (отжиг). Присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени происходит при оптимальной температуре (40-65⁰С). Праймеры, состоящие из 20-30 нуклеотидов, подобраны так, что ограничивают определенный фрагмент ДНК и комплементарны противоположным цепям ДНК.

3. Элонгация. Температуру реакционной смеси доводят до оптимальной для активности Taq-ДНК-полимеразы (72⁰С), которая достраивает вторую цепь ДНК, начиная синтез от 3'-конца каждого праймера, то есть, синтез идет от 5'-конца к 3'-концу имеющейся нити ДНК.

В итоге первого цикла образуются две молекулы ДНК, идентичные оригиналу, но не по всей длине, а только тем участкам ДНК, которые ограничены праймерами. При этом, во время первого цикла удлинение новой цепи от праймера заканчивается произвольно, а со второго цикла в смеси накапливаются специфические продукты амплификации - ампликоны, ограниченные по длине двумя праймерами.

Добавляемый в реакционную смесь фермент - термостабильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза) достраивает вслед за каждым праймером вторую цепь.

В результате получается 2 двухцепочечные молекулы ДНК. Затем этот процесс повторяется 20-35 раз до получения миллионов копий исходного фрагмента ДНК (ампликона).

Теоретический расчёт показывает, что за 20 циклов в идеальном случае из 1 молекулы ДНК может получиться миллион копий.

Так же теоретически можно предположить, что, пользуясь этим методом, можно обнаружить даже одну молекулу ДНК, но на практике эта чувствительность составляет десятки или сотни копий тестируемого гена или, соответственно, микробных клеток.

Введение в реакцию дополнительной ступени - синтеза ДНК на РНК обратной транскриптазой позволяет выявлять и РНК

Принцип метода полимеразной цепной реакции

Суть метода заключается в многократном копировании (амплификации) в пробирке определенных участков ДНК (мишеней) в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ДНК-полимеразой.

Для проведения амплификации необходимы следующие компоненты:

1. ДНК-матрица (ДНК или ее часть, содержащая искомый специфический фрагмент).

2. Праймеры - искусственно синтезированные олигонуклеотиды, как правило, имеющие размер от 15 до 30 н.п. Они комплементарны соответствующим участкам ДНК-мишени. Правильный выбор праймеров и специфического фрагмента ДНК играют ключевую роль в обеспечении специфичности и чувствительности всего анализа в целом.

3. Смесь четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ - дезоксиаденозинтрифосфат, гуанозин, цитозин, тимидин), являющихся "строительным материалом" для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.

4. Фермент Taq-полимераза. Это термостабильная ДНК-полимераза - фермент, обеспечивающий достраивание 3' -конца второй цепи ДНК, согласно принципу комплементарности.

5. Буферный раствор - смесь катионов и анионов в определенной концентрации, что обеспечивает оптимальные условия для реакции и стабильное значение pH в реакционной смеси.

Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, которые протекают при различных температурах:

1 этап - денатурация ДНК (расплетение двойной спирали). Для этого реакционную смесь нагревают до температуры 92-95 градусов, в результате чего двухцепочечная молекула ДНК расплетается с образованием двух одноцепочечных молекул.

2-этап - присоединение праймеров (отжиг). Праймеры подбирают так, чтобы они ограничивали (фланкировали) искомый фрагмент и были комплементарны противоположным цепям ДНК. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига.

3-этап - достраивание цепей ДНК. Синтез идет в направлении от 5' к 3' -концу цепи ДНК, начиная с участков присоединения праймеров. Элонгация катализируется термостабильной ДНК-полимеразой. Наиболее оптимальной температурой для работы фермента является температура в 70-72 градуса.

В результате первого цикла амплификации образуется две новых молекулы ДНК, которые уже сами служат матрицами во втором и последующих циклах амплификации. Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз) и на каждом цикле количество синтезированных копий фрагментов ДНК удваивается. В результате такого циклического процесса происходит экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК.

Если в исходном растворе первоначально находилась только одна двуцепочечная молекула ДНК, то за 30-40 циклов в растворе накапливается около 10^8 молекул ампликона. Этого количества достаточно для того, чтобы этот фрагмент четко детектировался методом электрофореза в агарозном геле.

Оптимизация ПЦР может проводиться по следующим параметрам:

- 1) Температурный режим реакции.
- 2) Состав реакционной смеси.

Touchdown ПЦР

Принцип проведения «Touchdown ПЦР», заложен в самом названии и состоит в следующем. Температура отжига праймеров в первом цикле ПЦР задается на 10-15°C выше рассчитанной. А затем, в ходе последующих циклов происходит постепенное снижение температуры, пока она не достигнет уровня на 5°C ниже расчетного. Исходно, при разработке данного подхода, предполагалось снижение температуры на 1 градус через каждые 2 цикла в течение 10 циклов. Однако на практике используют, в зависимости от поставленных целей, различные алгоритмы снижения температуры.

При проведении ПЦР данным способом, удается избавиться от несоответствия между рассчитанной температурой и реальной оптимальной (для данных конкретных условий) температурой отжига и, как следствие, повысить специфичность и чувствительность анализа.

ПЦР с использованием "горячего старта"

При подготовке реакционной смеси все компоненты смешивают при комнатной температуре и несмотря на то, что оптимальной температурой для активности полимеразы является температура 70-72°C, этот фермент начинает работать уже при комнатной температуре и в результате, еще до момента начала термоциклирования, может проходить неспецифический отжиг праймеров на ДНК-матрицу. Как следствие - образование неспецифических продуктов реакции и праймер-димеров.

Образовавшиеся на этапе смешивания реакционной смеси, или в ходе первых циклов полимеразной цепной реакции неспецифические продукты амплификации, будут амплифицироваться на протяжении всех оставшихся циклов ПЦР. Это приводит к уменьшению чувствительности реакции за счет ослабления амплифицируемого сигнала или маскировки его высоким фоном.

Чтобы повысить специфичность и чувствительность ПЦР применяют технику "горячего старта". "Горячий старт" - это модификация метода ПЦР, при которой ПЦР начинают при повышенной температуре, а фермент Taq-полимеразу добавляют только после прогревания смеси при температуре денатурации ДНК или же при температуре выше температуры отжига праймеров.

Существуют различные варианты реализации методики "горячий старт":

1. Внесение в реакционную смесь Taq-полимеразы во время первого цикла после прогрева пробирки до температуры денатурации (ручной вариант). Использование такого ручного варианта "горячего старта" усложняет весь процесс постановки реакции. В начале требуется смешать все компоненты реакции за исключением фермента, а иногда и праймеров,

прогреть реакционную смесь выше температуры отжига праймеров, и только затем добавить фермент (и праймеры, если их не добавляли) в горячую смесь. Все это достаточно трудоемко, особенно в случае большого числа тестируемых образцов и, кроме того, повышает опасность контаминации реакционной смеси и окружающей среды (в лаборатории).

Со временем данная постановка реакции была упрощена и появился второй вариант методики "горячий старт".

2. Разделение ингредиентов реакционной смеси на части с помощью легкоплавкого парафина, воска или масла (в нижней части реакционной смеси – праймеры, буферный раствор, в верхней – Taq-полимераза и проба ДНК).

Части реакционной смеси смешиваются при достижении температуры плавления материала прослойки (парафина). Проблема данного способа может заключаться в неравномерном смешивании компонентов реакционной смеси.

И третий вариант модификации методики "горячий старт".

3. Применение химически модифицированной формы ДНК-полимеразы. Модифицированная полимеразы это значит, что активный центр фермента связан с моноклональными антителами и таким образом фермент становится неактивным. Когда фермент добавляется в реакционную смесь при комнатной температуре, он неактивен и, таким образом, не может «работать» с праймерами. Если даже некоторые праймеры отожделись на «неправильной» матрице, из-за отсутствия активности у фермента, неспецифический продукт не будет синтезирован и наработан в процессе ПЦР. Для того, чтобы перевести полимеразу в активную форму необходимо ее прогреть при высокой температуре в течение определенного времени. При этом моноклональные антитела необратимо денатурируются и освобождают активные центры полимеразы и начинается полимеразная цепная реакция.

Такой способ активации фермента является очень удобным еще и потому, что помимо начальной активации полимеразы одновременно происходит полная денатурация ДНК-матрицы (расхождение нитей ДНК), что исключает вероятность неправильного отжига праймеров и, соответственно, синтеза неспецифических фрагментов (амплификатов).

Таким образом, использование данного методического подхода постановки ПЦР приводит в результате к значительному повышению специфичности, чувствительности анализа, а также увеличению количества конечного продукта.

Внутренние контроли при проведении анализа методом ПЦР

Любая диагностическая система имеет целый ряд контролей, как минимум отрицательный и положительный контроли. В тест-системах, использующих метод ПЦР, также заложены положительный и отрицательный контроли. В качестве положительного контроля используют либо препарат тотальной ДНК искомого микроорганизма либо клонированные в рекомбинантных плаزمиде специфические участки его генома. Этот контроль используют для того чтобы:

1) иметь маркер сравнения с результатами амплификации тестируемого образца;

2) для проверки работоспособности компонентов, входящих в состав реакционной смеси (прошла ли полимеразная реакция нормально).

Такой контроль тестирует вероятность сбоя тест-системы в целом, но не прохождение реакции амплификации в каждой конкретной пробирке по отдельности.

А такая необходимость существует, поскольку, как правило, для анализа используют препараты ДНК, выделенные из различных биологических материалов (кровь, ткани органов животных, испражнения и т.д.) и в них могут оставаться примеси веществ, ингибирующих ПЦР, что заметно снижает эффективность реакции, а в некоторых случаях приводит к отсутствию специфических ампликонов даже при наличии искомого возбудителя.

Поэтому, для того, чтобы контролировать ход амплификации в каждой пробирке в реакционную смесь добавляют дополнительный **внутренний контроль**. Он представляет собой любой препарат ДНК, несхожий с ДНК искомого микроорганизма (ДНК-мишенью) чаще всего по молекулярной массе. Как правило, это клонированный в каком либо плазмидном векторе фрагмент ДНК, к концам которого "пришивают" участки ДНК, гомологичные праймерам, входящим в состав тест-системы. Внутренний контроль, внесенный в реакционную смесь, становится такой же мишенью для отжига праймеров и будет амплифицироваться вне зависимости от того, есть в биологическом образце ДНК искомого микроорганизма или нет.

Размер внутреннего контроля подбирают таким образом, чтобы он отличался от специфических ампликонов в 2 и более раз.

Как интерпретировать полученные результаты при анализе неизвестной пробы методом ПЦР

Если отсутствуют полосы внутреннего контроля и специфической ДНК-мишени - такой результат считается недостоверным и его рекомендуется переставить, т.е. снова выделить ДНК и провести ПЦР.

Если есть полоса внутреннего контроля, а специфического ампликона нет - это свидетельствует о том, что ПЦР прошла нормально, а в исследуемом образце ДНК искомого возбудителя отсутствует. Такой результат считается отрицательным.

Если на электрофореграмме присутствуют две полосы - значит в исследуемом образце присутствует искомый микроорганизм.

Также положительным считается анализ (в образце присутствует искомый микроорганизм) если прошла амплификация только искомой специфичной ДНК возбудителя, а амплификация ДНК внутреннего контроля не прошла. В этом случае наблюдается эффект конкуренции за праймеры и компоненты реакционной смеси между ДНК внутреннего контроля и искомой матрицы. Безусловно, такая конкуренция всегда снижает чувствительность анализа. Особенно это заметно при низких концентрациях искомой ДНК в пробе. В конечном итоге это может привести к получению ложноотрицательного результата. Поэтому главным при использовании данного варианта ПЦР-анализа является тщательный подбор концентрации ДНК внутреннего контроля, чтобы он не составлял конкуренции для амплификации даже единичных молекул ДНК искомого микроорганизма.

На сегодняшний день практически все крупные компании, занимающиеся производством тест-систем для ПЦР анализа, взяли на вооружение именно этот формат проведения амплификации как наиболее надежный и достоверный.

Введение в набор внутреннего контроля сейчас является чуть ли не обязательным условием при лицензировании нового генодиагностического препарата.

Регистрация результатов ПЦР.

Благодаря высокому содержанию ПЦР-продуктов можно использовать неизотопные методы детекции.

Полученные в полимеразной цепной реакции амплификаты чаще всего визуализируются в виде полос, соответствующих фрагментам ДНК определенных молекулярных масс, в 2-3% геле агарозы или полиакриламидном геле после электрофореза и окраски раствором бромистого этидия. Результаты электрофореза ампликонов сравнивают с положительным контролем (ДНК выявляемого микроорганизма или известная ДНК); в отрицательном контроле ампликоны должны отсутствовать. На основании результатов просмотра гелевой пластинки делается вывод о наличии детектируемого микроорганизма в образце.

2. Генодиагностические тест-системы нового поколения

Гнездовая ПЦР (nested-PCR)

Это одна из распространенных в настоящее время модификаций ПЦР-анализа.

Суть метода заключается в том, что в реакции используют две пары праймеров - внутренние и внешние. Первая пара комплементарна концам искомого фрагмента ДНК микроорганизма, а вторая пара праймеров комплементарна внутреннему участку ампликона, образовавшемуся в первом раунде амплификации с внешними праймерами. Существует два варианта проведения гнездовой ПЦР.

В первом варианте реакция проходит в 2 этапа с использованием различных реакционных смесей. Первые 25-30 циклов проходят с внешними праймерами. Затем аликвоту (часть) наработанных ампликонов переносят в другую пробирку и проводят еще 25-30 циклов амплификации со второй парой праймеров.

Во втором варианте реакция проводится в единой реакционной смеси, но температура отжига внутренних праймеров подбирается так, чтобы они на первом этапе амплификации не участвовали в реакции.

Такой вариант проведения ПЦР дает значительные преимущества в специфичности, т.к. даже если на первом этапе прошло образование неспецифических продуктов, то на втором этапе за счет работы второй пары праймеров вся «неспецифика» удаляется. Чувствительность увеличивается как минимум на порядок, а в некоторых случаях и более.

Этот вариант ПЦР-анализа часто используют для диагностики вирусных инфекций.

Мультилокусная ПЦР (multi-PCR - multipolymerase chain reaction)

Суть метода состоит в том, что одновременно в реакции амплификации может участвовать две, четыре и более пар неперекрещивающихся праймеров и таким образом появляется возможность проведения быстрого многофакторного анализа образца по нескольким параметрам одновременно в зависимости от поставленных задач исследования, либо это идентификация одного вида микроорганизмов, либо одновременная индикация нескольких разных видов микроорганизмов.

Это наиболее широко известная и распространенная модификация метода ПЦР-анализа. Фактически один из вариантов «nested-PCR», когда идет совместная амплификация с внешними и внутренними праймерами, также является вариантом мультилокусной ПЦР. Или же вариант ПЦР-анализа с использованием «внутреннего контроля».

В настоящее время тест-системы, использующие данный методический приём, выпускаются московской фирмой "Литех" для одновременной детекции нескольких возбудителей мочеполовых инфекций (*C. trachomatis*, *M. hominis* и *U. Urealyticum*). НПФ "ДНК-Технология" выпускает наборы для выявления микобактерий туберкулеза (*M. tuberculosis*, *M. bovis*). Большой перечень тест-систем в мультилокусном варианте выпускает ЦНИИ эпидемиологии (г. Москва).

Обратно-транскрипционная ПЦР - ОТ-ПЦР (RT-PCR - reverse transcription - polymerase chain reaction).

В основном этот методический подход ПЦР-анализа используют при идентификации вирусов.

Суть метода состоит в проведении дополнительного этапа обратной транскрипции. Поскольку многие вирусы являются РНК-содержащими, то перед постановкой ПЦР сначала проводят этап обратной транскрипции РНК с использованием фермента - РНК-зависимой ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы (ОТ). В результате обратной транскрипции РНК образуется комплементарная молекула ДНК. Эта образовавшаяся молекула комплементарной ДНК и используется в дальнейшем в качестве мишени при амплификации с помощью Taq-полимеразы.

Есть еще один вариант проведения ОТ-ПЦР, когда вместо РНК-зависимой, используется ДНК-зависимая ДНК-полимераза, которая катализирует оба процесса - сначала обратную транскрипцию, а затем, при добавлении хелаторов, работает как обычная ДНК-полимераза.

ПЦР in situ

Особенность заключается в способе проведения ПЦР. Амплификация проходит не в пробирке, а на поверхности предметного стекла с фиксированным тканевым срезом или клеточным монослоем.

Для проведения реакции требуется специальный амплификатор, в котором изменяется температура воздушных потоков в специальной камере, куда устанавливаются стекла со срезами и реакционной смесью.

Детекция продуктов полимеразной цепной реакции проводится двумя способами:

1) метод непрямой гибридизации, когда на монослой после амплификации наносится меченный флуоресцентной меткой ДНК-зонд и таким образом детектируются продукты реакции. Этот метод обеспечивает максимальную специфичность детекции.

2) И второй метод прямого выявления меченных нуклеотидов (дигоксигенин-11-дУТФ, флюоресцеин-дУТФ), которые включаются в состав ампликонов в процессе полимеразной цепной реакции.

Достоинства этого метода заключаются в том, что он позволяет установить место локализации искомой ДНК внутри эукариотической клетки. При постановке этого анализа не требуется проведения этапа пробоподготовки.

ПЦР *in situ* позволяет определять типы клеток, в которых произошли изменения, распределение поврежденных клеток в тканях, проводить сравнение с результатами гистологического и цитохимического исследований.

Лигазная цепная реакция - ЛЦР (LCR - Ligase chain reaction)

Этот метод основан на последовательных циклах лигирования (соединения) олигонуклеотидных зондов, комплементарных цепям ДНК-матрицы. Метод был предложен D. Wu и R. Wallace в 1989 году.

Характерной особенностью ДНК-лигазы является высокая специфическая активность при лигировании одноцепочечных разрывов на второй комплементарной цепи, и низкая активность при сшивании одновременно двух разрывов на обеих цепях или разрыва на однострессовой ДНК.

Основными компонентами реакции являются лигаза, два или четыре специфических праймера и буфер для реакции. При использовании одной пары праймеров идет линейная амплификация. Если в реакцию вводят две пары праймеров, комплементарных двум цепям ДНК-матрицы, то достигается экспоненциальная амплификация. На первом этапе происходит гибридизация двух пар праймеров с ДНК-матрицей при температуре +65°C. Затем осуществляется их лигирование в месте соединения. Специфичность реакции обеспечивается тем, что любое нарушение гомологии в области стыков олигонуклеотидов сразу же предотвращает их лигирование. На втором этапе при температуре +95°C происходит денатурация и отделение лигированного продукта от матрицы. Далее, при охлаждении реакционной смеси до +65°C процессы гибридизации и лигирования повторяются. В этом случае продукт лигирования выступает уже в качестве матрицы.

На основе этой реакции разработаны тест-системы для идентификации *Chlamidia trachomatis*, *Micobacterium tuberculosis*.

Количественная ПЦР (Real time PCR)

Дальнейшее развитие метода ПЦР было направлено на количественное определение нуклеиновых кислот в анализируемой пробе.

Существует несколько приемов количественной оценки продуктов амплификации. Например, количественная ПЦР с использованием внутреннего контроля-стандарта или метод "конечных разведений". Так или иначе, все эти методы достаточно трудоемки, длительны и сложны в интерпретации. Поэтому на сегодняшний день предложен метод, лишенный этих недостатков - это метод ПЦР в реальном времени (Real time PCR). Сущность метода заключается в исследовании накопления продуктов амплификации с помощью специального прибора без последующего электрофореза. Так как кинетика накопления ампликонов связана с исходным количеством матрицы, это дает возможность точно оценить её количество в анализируемой пробе. Основными достоинствами данного метода, являются:

возможность количественного определения ДНК/РНК микроорганизмов в исследуемом материале;

отсутствие стадии электрофореза;

менее строгие требования к организации ПЦР-лаборатории;

автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов (метод используется чаще всего для выявления патогенных микроорганизмов).

Отсутствие стадии электрофореза позволяет свести к минимуму риск контаминации и следовательно уменьшить число ложноположительных результатов. Поскольку регистрация результатов идет непосредственно в процессе ПЦР, весь анализ можно проводить в 1-2 комнатах и можно отказаться от дополнительного помещения для детекции продуктов реакции.

Регистрация амплификации в режиме реального времени осуществляется следующими наиболее распространенными подходами:

1. Выщепление 5' концевой метки (TaqMan Assay).
2. Использование зондов с комплементарными концевыми последовательностями (molecular beacons).
3. Применение 2-х зондов с резонансным переносом энергии (LightCycler assay).
4. Использование интеркалирующих агентов.

Первый подход основан на использовании 5'-экзонуклеазной активности полимеразы. В реакционную смесь добавляют ДНК-зонды, в состав которых входит флуоресцентная метка в 5'-положении и гаситель флуоресценции в 3'-положении, а также фосфатная группа в 3'-положении. Эти зонды имеют места посадки внутри амплифицируемой области. Гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу. Во время стадии отжига праймеров

происходит присоединение ДНК-зонда к комплементарной цепи ДНК. В ходе элонгации полимераза синтезирует цепь ДНК и при достижении зонда начинает его расщеплять благодаря наличию 5'-экзонуклеазной активности. Таким образом происходит разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что приводит к увеличению детектируемого свечения. При этом, чем больше ампликонов было наработано в ходе ПЦР на данный момент времени, тем интенсивнее будет свечение.

Второй подход отличается от выше описанного тем, что концевые последовательности зонда представляют собой взаимно комплементарные области, поэтому при температуре отжига праймеров они схлопываются и образуют шпильки. Внутренняя область зондов комплементарна амплифицируемой молекуле. При отжиге праймеров зонды, не присоединившиеся к ДНК матрице, остаются в "схлопнутом" состоянии, так что происходит тушение флуоресценции. Те же зонды, которые отжигаются на матрицу, разворачиваются, и флуоресцентная метка и гаситель расходятся в разные стороны. Таким образом, увеличивается интенсивность свечения.

Третий способ детекции отличается повышенной специфичностью, так как увеличение флуоресценции происходит при комплементарном связывании с ампликонами сразу 2-х ДНК зондов. Принцип метода заключается в переносе энергии от одного флуорофора, находящегося на 3' конце первого зонда, ко второму флуорофору, находящемуся на 5' конце второго зонда, причем расстояние между флуорофорами составляет 1-3 нуклеотида. При одновременном связывании обоих зондов с ДНК матрицей испускаемое первым флуорофором излучение передается на второй флуорофор, а его излучение детектируется прибором. Таким образом, возрастает специфичность анализа.

Следующий способ детекции основан на том факте, что флуоресценция например бромистого этидия (и SYBR Green I) значительно возрастает при его внедрении в двухцепочечные молекулы ДНК. Таким образом, можно наблюдать за накоплением продуктов амплификации. Очень важно отметить то, что увеличение флуоресценции может быть связано как с накоплением специфического продукта, так и неспецифического (праймеры-димеры, шмер). Для получения корректных результатов необходимо дополнительное изучение полученных ампликонов с помощью построения так называемых "кривых плавления" (melting curves). Для этого после окончания ПЦР реакционную смесь нагревают и непрерывно измеряют флуоресценцию. По достижении температуры плавления продукта амплификации флуоресценция резко снижается. Каждое резкое уменьшение флуоресценции на графике соответствует числу полосок, получаемых на электрофорезе, то есть числу

разных типов ампликонов. Для облегчения работы с полученной информацией проводят дифференциальный анализ кривой плавления. Использование кривых плавления не требует от оператора никаких дополнительных манипуляций с пробирками, а интерпретация полученных данных автоматизирована.

Для постановки ПЦР в реальном времени используется специальный амплификатор с возможностью детектировать флуоресценцию, отражающую накопление ампликонов при каждом цикле амплификации. На сегодня существует много подобных приборов: это "iQ iCycler" ("Bio-Rad"), несколько типов "ABI Prism" ("Applied Biosystems"), "LightCycler" ("Roche"), "SmartCycler" ("Cepheid"). Считается, что лучшим прибором по соотношению цена/качество является "iQ iCycler" фирмы "Bio-Rad". Он позволяет проводить одновременную детекцию до 4 инфекционных агентов в одной пробирке, т.е. проводить мультиплексную ПЦР. В комплект с прибором входит пакет программного обеспечения.

ПЦР в реальном времени (в течение последних пяти лет) уже успешно применяется в крупнейших диагностических и научно-исследовательских центрах развитых стран мира и в ближайшее время станет так же широко распространена, как и ПЦР. В нашей стране также ведутся работы в данном направлении.

3. Биочипы

Биочипы делятся на две конструктивно разные группы:

Матричные чипы, представляющие собой микропластинку, размером 1 - 2 см², с дискретно иммобилизованными с большой плотностью молекулярными зондами, способными избирательно связывать те или иные вещества, присутствующие в анализируемых образцах.

Капиллярные чипы - миниатюрная система для разделения сложных смесей различных соединений физико-химическими методами, такими как хроматография или электрофорез, часто совмещенная с миниатюрной ячейкой для проведения ПЦР или других химических реакций ("лаборатория-на-чипе").

В матричных биочипах в качестве зондов могут быть использованы любые молекулы, способные образовывать специфические комплексы - фрагменты нуклеиновых кислот, антитела, клеточные рецепторы, ферменты и даже некоторые виды олигосахаридов.

Для гибридизационного анализа с помощью чипа используют предварительно меченную ДНК-мишень. Теоретически метка может быть любой, но все коммерчески доступные в настоящее время детектирующие

устройства ("чип-ридеры") используют различные типы флуоресцентных меток. Гибридизационные ДНК-чипы различаются по размеру иммобилизованных фрагментов ДНК, по методам иммобилизации молекул, по способам гибридизации и детекции сигнала.

В России технология гибридизационных чипов развивается с 1988 г. в Центре биологических микрочипов на базе Института молекулярной биологии им.Энгельгардта под руководством академика Мирзабекова. Разработаны высокоплотные ДНК-чипы на основе миниатюрных полиакриламидных гелей с максимальным размером до 1 мм³. На сегодняшний день подготовлено несколько чипов для анализа генов человека, чип для типирования и определения антибиотикоустойчивости у возбудителя туберкулеза, чип для индикации и идентификации возбудителя сибирской язвы и чип для выявления вируса натуральной оспы.

Имеется информация о создании биопича для индикации 14 вирусных возбудителей менингита.

Капиллярный микрочип представляет собой пластинку, размером 2 - 5 см², из химически инертного материала (стекло, силикон, кварц, пластик и др.), в которой вытравлены пересекающиеся микрокапиллярные каналы и камеры самой различной топологии и в различном количестве с минимальным общим объемом порядка 50мкл. Работа на капиллярных чипах предполагает использование широкого спектра современных достижений микротехники - микронасосов для подачи и продвижения проб и реагентов по капиллярам (в объеме 1 пиколитр), микротермодатчиков и микронагревателей для термостатирования пробы, микроэлектродов для проведения электрофореза и т.п. Капиллярный биочип в использовании принципиально проще, чем матричный. Такой чип, разработанный фирмой Serheid (США) может применяться в полевых условиях неквалифицированным персоналом, давая результат через 30мин. В общем топология капиллярного чипа определяется конкретными целями, для которых данный чип создается. Для создания аналитических систем на основе капиллярных микрочипов важен прежде всего высокий технологический уровень и опыт работы в области микротехники.

Оригинальный 96-канальный капиллярный микрочип с радиально расположенными каналами для анализа ПЦР-продуктов с помощью электрофореза разработан в научном центре Berkley. На сегодняшний день это самый "многоканальный" чип, но уже сейчас технические возможности позволяют создать чип на тысячу и более каналов. Фирмой Oak Ridge (США) разработан 4-х канальный микрочип, позволяющий автоматически выделять ДНК из бактериальных клеток, амплифицировать их и анализировать длину

ПЦР-продуктов. На настоящий момент реальными заказчиками таких систем являются фармацевтические компании. При поиске новых лекарственных препаратов такая система может заменить целую химическую лабораторию, существенно (более, чем на три порядка) сократить количество реактивов и времени.

Многие фирмы, производящие ДНК-чипы, также заявляют о создании "иммуночипов". Преимущества таких систем перед обычными наборами для иммунодиагностики связаны с возможностью параллельного определения в анализируемом препарате нескольких антигенов, со значительным сокращением времени анализа, снижением лабораторных трудозатрат.

Перспективы использования иммуночипов очевидны уже сегодня. В частности, для тестирования вируса гепатита С. Различие вирусной РНК HCV, получаемой из разных источников, может достигать 40%, что затрудняет использование отдельных олигонуклеотидных зондов (праймеров) для диагностики. Это создает предпосылку для создания биочипа, содержащего 5 - 20 наиболее существенных иммунологических детерминант вирусов гепатита С тех типов, которые распространены на территории РФ, что позволит сконструировать универсальный чип, пригодный не только для первичного выявления вируса и его типирования, но и мониторинга развития иммунного ответа, что может иметь важное значение для прогноза болезни и выбора тактики лечения.

Биологические микрочипы находят свое практическое применение в различных областях медицины: в лабораторной диагностике инфекционных и наследственных болезней, в судебно-медицинской экспертизе, при детекции низкомолекулярных органических веществ небелковой природы (непептидных гормонов, лекарственных и наркотических агентов), при мониторинге вредных примесей в окружающей среде (тяжелых металлов). Безусловно очевидна перспектива их использования для выявления и идентификации наиболее опасных для здоровья и жизни людей высококонтагиозных инфекционных агентов бактериальной и вирусной природы.

Американская фирма Serheid (США), работающая с области микрофлюидных систем, сосредоточила свои усилия на создании полностью автоматизированных анализаторов ДНК и миниатюрной диагностической системы для быстрой идентификации биологических патогенов. Этой фирмой выпускаются автоматические приборы для ДНК-анализа.

В России также существуют опытно-конструкторские лаборатории, занимающиеся созданием биологических микрочипов. Так, Институтом

аналитического приборостроения РАН (г. Санкт-Петербург) совместно с ГНЦ "Курчатовский институт" разработаны автоматизированные капиллярные системы разделения вирусов и бактерий из смывов. В ближайшее время предполагается создание автоматических систем выделения бактерий и вирусов, с последующим анализом их антигенной структуры или выделения из них ДНК (РНК).

Тема: №9

«Факторы патогенности микроорганизмов и методы их выявления»

Вопросы:

1. Эволюция микробного паразитизма и происхождение патогенных микроорганизмов
2. Способность микроорганизмов к колонизации эпителиальных поверхностей макроорганизма
3. Капсулообразование- важный фактор патогенности микроорганизмов
4. Ферменты как фактор патогенности микроорганизмов
5. Инвазивность
6. Токсигенность микроорганизмов
7. Роль экзоферментов в патогенности микроорганизмов
8. Изучение адгезивных свойств микроорганизмов
9. Определение коагулазной и гиалуронидазной активностей микроорганизмов

1. Эволюция микробного паразитизма и происхождение патогенных микроорганизмов

Паразитизм, так же как и другие формы взаимоотношений между паразитами и их хозяевами, возник, развивался и совершенствовался в процессе эволюции микроорганизмов. Полагают, что свободноживущие микроорганизмы-сапрофиты появились свыше 3 млрд лет тому назад во время зарождения жизни на нашей планете, а микроорганизмы-паразиты значительно позже — по мере образования эукариотов.

В основе паразитизма лежат расширение и обновление экологических возможностей сапрофитов, поскольку перед ними открылись новые экологические сферы распространения. Так, возникли факультативные (необязательные) паразиты, многие из которых, не нанося заметных повреждений организму хозяина, извлекают для себя пользу. Такая форма межвидовых отношений называется комменсализмом. Она характерна для сапрофитных гнилостных микроорганизмов, которые освоили новую экологическую нишу — кишечник животных и человека. К ним относятся условно-

патогенные, или оппортунистические, виды бактерий (эшерихии, протей и др.), дрожжеподобных грибов, популяции которых в нормальных условиях не наносят ущерба хозяину. Однако в экстремальных ситуациях данные микроорганизмы вызывают патологические процессы.

По мере увеличения зависимости от организма хозяина происходило дальнейшее совершенствование паразитизма, которое привело к появлению патогенных видов — возбудителей инфекционных заболеваний людей и животных. Многие из них утратили сапрофитную форму в своем развитии в отличие от условно-патогенных микроорганизмов. Они оказались неспособными не только размножаться, но даже сохраняться в окружающей среде.

Так, возбудитель сифилиса, возбудитель коклюша и др. выживают во внешней среде всего несколько минут, энтеробактерии — несколько недель и месяцев и т.д. Однако спорообразующие патогенные (возбудитель сибирской язвы) и условно-патогенные бактерии (возбудители столбняка и газовой гангрены) сохраняются в течение многих месяцев и лет в виде спор.

По мере увеличения зависимости паразитов от организма хозяина появились факультативные внутриклеточные паразиты. К ним относят гонококки и менингококки, микобактерии туберкулеза, шигеллы и другие бактерии, способные размножаться в клетках организма человека. Перечисленные виды не утратили способности размножаться на искусственных питательных средах, что свидетельствует о сохранении у них набора ферментов, необходимых для анаболических и катаболических реакций. На более поздних этапах эволюции появились облигатные внутриклеточные паразиты, к которым относятся хламидии, риккетсии и патогенные простейшие. Эти возбудители сохранили клеточную организацию, но лишились генов, контролирующих образование ряда ферментов, необходимых для важнейших метаболических реакций, вследствие чего они утратили способность расти на питательных средах.

Таким образом, в результате регрессивной эволюции появились облигатные внутриклеточные паразиты с редуцированными метаболическими реакциями, целиком зависящие от своего хозяина. Как у внеклеточных, так и у внутриклеточных паразитов, подавляющее число которых относится к патогенным видам, в процессе эволюции появились факторы, защищающие их от неспецифической и иммунной защиты организма хозяина.

Основной движущей силой эволюции микробного паразитизма, во время которой сформировались патогенные виды, явились мутации и рекомбинации генов. В результате направленного отбора особей, наиболее приспособленных к конкретным условиям существования в организме человека, происходило совершенствование вирулентных и токсических свойств возбудителей, формирование новых их разновидностей и видов. Основные селективные факторы направленного отбора, действующие в организме человека и животных, относятся к неспецифической и иммунной защите организма хозяина, а также постоянно увеличивающемуся арсеналу этиотропных химиотерапевтических и иммунных (вакцины, иммуноглобулины) препаратов. При этом число новых генотипов, выживших в результате направленного отбора, находится в прямой зависимости от количества действующих селективных факторов. Это приводит к постоянному обновлению генофонда микробной популяции.

Особое значение в эволюции патогенов играет постоянная миграция информации с внехромосомными факторами наследственности или транспозируемыми элементами (транспозоны, плазмиды).

Они контролируют образование самых разнообразных продуктов: токсинов, ферментов, антигенов, которые в определенных случаях придают селективные преимущества несущим их клеткам возбудителя.

В этой связи встает вопрос о происхождении и роли транспозируемых элементов в эволюции патогенных микроорганизмов. Наиболее вероятно, что транспозируемые элементы произошли из хромосомных генов, которые приобрели способность выщепляться из состава бактериальных ДНК. Об этом свидетельствует тот факт, что хромосомные гены, как правило, ответственны за образование тех же факторов патогенности, которые контролируются транспозируемыми элементами. В автономном состоянии последние существуют в форме, способной вновь встраиваться в бактериальную хромосому. При этом нередко в месте интеграции возникают мутации вследствие изменения структуры хромосомных генов.

Таким образом, эволюционная роль внехромосомных факторов наследственности состоит в повышении гетерогенности бактериальных популяций, что в конечном итоге способствует выживанию тех биоваров с измененной антигенностью и патогенностью, которые

наиболее приспособлены к данным конкретным условиям существования в организме своего хозяина.

К основным факторам патогенности (вирулентности) относят способность микроорганизмов к колонизации, их устойчивость к разным микробиоцидным факторам микроорганизма, свойства инвазивности и токсигенности, а также способность к длительному персистированию.

2. Способность микроорганизмов к колонизации эпителиальных поверхностей макроорганизма

Адгезия

Размножению бактерий в первичном очаге инфицирования предшествует адгезия (от лат. Adhaesio, прикрепляться к чему-либо), то есть закрепление бактерий на поверхности клеток макроорганизма, что, собственно; и служит началом инфекционного процесса. Прикрепление к поверхности клеток (например, к эпителию слизистых оболочек) обеспечивают адгезины, или факторы колонизации— различные микробные продукты— молекулы адгезии (белки, ЛПС, тейхоевые кислоты). Молекулы адгезии могут располагаться непосредственно на поверхности бактериальной клетки либо входить в состав микроворсинок или капсул. Взаимодействие инфекционного агента с эпителиальными клетками происходит в результате нескольких типов связей различных по природе и специфичности. Выделяют связи, основанные на взаимодействии электростатических сил, обусловленные гидрофобными свойствами поверхности, лиганд-рецепторные взаимодействия.

Заряд. Бактериальные и эукариотические клетки заряжены отрицательно, но поверхностные микроворсинки грамотрицательных бактерий снижают заряд бактерий и уменьшают электростатические силы отталкивания.

Гидрофобность. Бескапсульные бактерии обладают высокой гидрофобностью, усиливающей адгезивность; гидрофобные участки обладают сродством к лигандам на поверхности эукариотических клеток, что и приводит к прочности связи.

Специфические взаимодействия. На поверхности бактерий имеются молекулы, способные к стереоспецифичному связыванию с комплементарными молекулами на мембранах эукариотических клеток (например, гемагглютинины или тейхоевые кислоты).

Другие механизмы колонизации. Некоторые бактерии способны «заранее подготавливать» место для дальнейшего размножения; например,

нейраминидаза облегчает проникновение холерного вибриона через слой слизи и контакт с сиалосодержащими рецепторами эпителия кишечника. Микроорганизмы также способны сорбироваться на бактериях, уже колонизировавших поверхность слизистых оболочек, либо связывать белки (например, фибронектин), рецепторы к которому имеются на многих клетках макроорганизма. У капсулированных бактерий в прикреплении активно участвуют полисахариды капсулы.

Для успешной колонизации очага первичного инфицирования бактерии должны выдержать действие многочисленных и разнообразных микробиоцидных факторов макроорганизма. Для защиты от них микроорганизмы активно используют ряд структур (например, капсулы) и синтезируемых веществ (например, ферменты).

3. Капсулообразование - важный фактор патогенности микроорганизмов

Капсула (или её менее выраженный аналог — слизистый слой) ингибирует начальные этапы защитных реакций макроорганизма — распознавание и поглощение.

- Капсулы «экранируют» бактериальные структуры, активирующие систему комплемента, а также структуры, распознаваемые иммунокомпетентными клетками. Например, слой капсульного вещества защищает тейхоевые кислоты стафилококков от связывания опсонинами.

- Гидрофильность капсул затрудняет их поглощение фагоцитами, а само капсульное вещество защищает бактерию от действия лизосомальных ферментов и токсичных оксидантов, выделяемых фагоцитирующими клетками.

- Большое значение имеет лёгкая отделяемость капсул или слизистого слоя от поверхности бактерий. В частности, при поглощении капсулированных бактерий (например, синегнойной палочки), последние легко «снимают с себя» капсулы и избегают прямого контакта с фагоцитом.

4. Ферменты как фактор патогенности микроорганизмов

Микроорганизмы синтезируют различные ферменты, обезвреживающие многие гуморальные защитные факторы. Например, многие возбудители, особенно паразитирующие на слизистых оболочках, выделяют протеазы, расщепляющие в том числе и молекулы IgA. В инактивировании токсических кислородных продуктов фагоцитов задействованы каталаза и супероксид-

дисмутаза. Бактериальные ферменты также способны изменять pH окружающей среды, делая её пригодной для размножения. Например, *Helicobacter pylori* выделяют уреазу, нейтрализующую кислую среду в желудке.

5. Инвазивность

Патогенность многих микроорганизмов (например, шигелл) связана с проникновением в эпителиальные клетки, где они размножаются, вызывая нарушение целостности пласта эпителия. Основные факторы, обеспечивающие инвазивность бактерий, — подвижность (обеспечивает проникновение как в клетки, так и межклеточные пространства) и особые клеточные факторы — инвазины (от лат. *invasio*, проникать, атаковать), способствующие проникновению в эпителиоциты посредством эндоцитоза (например, поверхностные белки грамотрицательных бактерий). Некоторые микроорганизмы проникают за пределы эпителия либо посредством активной инвазии, либо в результате имплантации через различные повреждения кожных покровов. Как разновидность инвазии можно рассматривать способность микроорганизмов диссеминировать из первичного очага инфекции и распространяться по макроорганизму с током крови.

6. Токсигенность микроорганизмов

Токсины

Токсины (от греч. *toxikon*, яд) — важнейшие факторы патогенности, вырабатываемые микроорганизмами и реализующие основные механизмы инфекционного процесса. Роль микробных токсинов в патогенезе инфекционных болезней впервые доказали Э. Ру и А. Иерсён (1888г.), отделившие «ядовитое начало» возбудителя дифтерии от бактериальных клеток и сумевшие воспроизвести с его помощью клиническую картину болезни у морских свинок.

Токсины облегчают первичную колонизацию и вызывают системные поражения, характеризующие специфические проявления той или иной инфекционной болезни. Некоторые токсины не ведут к развитию клинической картины, но вносят вклад в патогенез заболевания (так называемые **парциальные токсины**). Спектр активности токсинов необычайно широк: от веществ, облегчающих распространение по тканям, до метаболитов, селективно повреждающих активность определённых клеток. Бактериальные токсины традиционно подразделяют на **эндотоксины** и

экзотоксины (их основные характеристики представлены в таблице), хотя подобная классификация не совсем корректна. Более правильной была бы систематизация токсинов по химическому составу (например, фосфолипазы или детергенты) либо по механизму действия, например, на поражающие клеточную мембрану (**цитолизины**) и действующие на различные внутриклеточные мишени. К сожалению, химический состав значительной части токсинов и комплекс оказываемых ими биологических эффектов изучены недостаточно. Многие бактериальные токсины вырабатываются в форме предшественников (**протоксины**), трансформирующихся в активную форму. За единицу измерения биологической активности токсинов, как и вирулентности микроорганизмов, принята величина летальной дозы.

Экзотоксины

Экзотоксины — *секреторные белковые вещества, обычно проявляющие ферментативную активность*. Нередко экзотоксины служат единственным фактором вирулентности микроорганизма, действуют дистанционно (далеко за пределами очага инфицирования) и ответственны за клинические проявления инфекции (например, энтеротоксины вызывают диарею, нейротоксины — параличи и другие неврологические симптомы). Наибольшую токсичность проявляет ботулотоксин — 6 кг токсина могли бы убить всё человечество. Высокая токсичность экзотоксинов обусловлена особенностью структуры их фрагментов, имитирующей строение субъединиц гормонов, ферментов или нейромедиаторов хозяина. В результате экзотоксины проявляют свойства антиметаболитов, блокируя функциональную активность естественных аналогов. *Экзотоксины проявляют высокую иммуногенность; в ответ на их введение образуются специфические нейтрализующие АТ (антитоксины)*. По степени связи с бактериальной клеткой экзотоксины разделяют на три группы — А, В и С.

Группа А — токсины, секретируемые во внешнюю среду (например, токсин дифтерийной палочки).

Группа В — токсины, частично секретируемые во внешнюю среду и частично ассоциированные с бактериальной клеткой (например, тетаноспазмин столбнячной палочки).

Группа С — токсины, связанные с бактериальной клеткой и высвобождающиеся после её гибели (например, экзотоксины энтеробактерий).

Свойства экзотоксинов

Экзотоксины обычно содержат бифункциональные (лигандные и эффекторные) структуры. Первые распознают и связывают комплементарный рецептор (ганглиозиды, белки, гликопротеины) на мембране клетки, вторые обеспечивают эффекторное действие, наиболее часто — гидролиз НАД до АДФ-рибозы и никотинамида с последующим переносом АДФ-рибозильного остатка на мишени.

- Связывание и проникновение экзотоксинов в определённой степени напоминает механизм действия пептидных и гликопротеиновых гормонов, что обусловлено родством их молекулярных структур. Внутриклеточная мишень для эффекторной части молекулы токсина — обычно жизненно важная система, например биосинтеза белка (для А-токсина синегнойной палочки и нейротоксина шигелл) либо аденилатциклазная система (для холерогена, термолабильного токсина кишечной палочки или экзотоксина *Bordetella pertussis*).

- Наиболее распространённая классификация экзотоксинов основана на характере мишеней для их эффектов: **нейротоксины** поражают клетки нервной ткани, **гемолизины** разрушают эритроциты, **энтеротоксины** поражают эпителий тонкого кишечника, **дерматонекротоксины** вызывают некротические поражения кожных покровов, **лейкоцидины** повреждают фагоциты (лейкоциты) и т.д.

- По механизму действия выделяют **цитотоксины** (например, энтеротоксины или дерматонекротоксины), **мембранотоксины** (например, гемолизины и лейкоцидины), **функциональные блокаторы** (например, холероген), **эксфолиатины** и **эритрогенины**. Нередко патогенные бактерии синтезируют несколько экзотоксинов, проявляющих различное действие (летальное, гемолитическое, цитотоксическое и т.д.).

Эндотоксины

В определённой степени токсигенным микроорганизмам (активно секретирующими токсинами) противопоставлены патогенные бактерии, обладающие токсическими субстанциями, слабо диффундирующими в окружающую среду и названные (по предложению Р. Пфайффера) эндотоксинами. *Эндотоксины — интегральные компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий; большая их часть высвобождается только после гибели бактериальной клетки.* Представлены комплексом протеинов, липидных и полисахаридных остатков. За проявление биологического эффекта ответственны все группировки молекулы эндотоксина. Биологическая активность напоминает таковую у некоторых медиаторов воспаления; эндотоксинемия обычно сопровождается

лихорадкой, обусловленной выбросом эндогенных пирогенов из гранулоцитов и моноцитов. При попадании значительного количества эндотоксина в кровоток возможен **эндотоксиновый шок**, обычно заканчивающийся смертью больного. Бактериальные эндотоксины проявляют сравнительно слабое иммуногенное действие, и иммунные сыворотки не способны полностью блокировать их токсические эффекты. Некоторые бактерии могут одновременно синтезировать экзотоксины и выделять (при гибели) эндотоксины (например, токсигенные *Escherichia coli* и холерные вибрионы).

Суперантигены

Некоторые токсины (например, токсин Дика стрептококков или энтеротоксин стафилококков) способны действовать как суперантигены, вызывая поликлональную активацию различных клонов лимфоцитов. Поликлональная активация сопровождается гиперсекрецией лимфокинов с развитием цитокиноопосредованной интоксикации.

Таблица Бактериальные токсины

	Экзотоксины	Эндотоксины
Продуцент	Грамположительные и грамотрицательные бактерии	Грамотрицательные бактерии
Локализация	Внутри-и внеклеточная	Внутриклеточная
Химическая природа	Пептиды	Комплексы «белок-ЛПС»
Стабильность при 100 °С	Лабильны	Стабильны
Инактивация формальдегидом	Инактивируются	Не инактивируются
Нейтрализация гомологичными АТ	Полная	Частичная
Биологическая активность	Индивидуальная для каждого токсина	Общая для всех токсинов
Токсичность*	100-1 000 000	0,1

Таблица Экзотоксины патогенных для человека бактерий

Продуцент	Токсин*
<i>Bacillus anthracis</i>	Комплексный летальный и отёчный факторы
<i>Bordetella pertussis</i>	Летальный и дермонекротизирующий
<i>Clostridium botulinum</i>	Ботулотоксины

<i>Clostridium oedematiens</i> (C. novyi)	α-летальный и дермoneкротиизирующий, β- летальный, дермoneкротиизирующий и гемолитический; γ-, летальный, дермoneкротиизирующий и гемолитический; δ-, гемолизин; ε- (эпсилон), летальный и гемолитический; ξ- (дзета), O ₂ -зависимый гемолизин
<i>Clostridium perfringens</i>	α-, летальный, дермoneкротиизирующий и гемолитический ; β- летальный; γ-летальный; δ- летальный; ε-летальный и дермoneкротиизирующий; 1- (йота), летальный и дермoneкротиизирующий; θ- (тета), летальный, кардиотоксический и гемолитический; κ- (каппа), летальный и протеолитический; λ- (лямбда), летальный и протеолитический
<i>Clostridium septicum</i>	α- летальный и гемолитический
<i>Clostridium sordelli</i>	Отёчный; геморрагический
<i>Clostridium tetani</i>	Тетаноспазмин, летальный и нейротоксический ; нейротоксин (не аналогичен тетаноспазмину): тетанолизин, летальный, кардиотоксический и гемолитический
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Дифтерийный токсин, летальный и дермoneкротиизирующий
<i>Escherichia coli</i>	Термолабильный энтеротоксин; термостабильный энтеротоксин
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Экзотоксин А
<i>Staphylococcus aureus</i>	α-, летальный, дермoneкротиизирующий и гемолитический; (β-, летальный и гемолитический; γ-, летальный и гемолитический; δ-, гемолизин; эксфолиатин; энтеротоксин
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Токсин Дика, эритрогенный; стрептолизин О, летальный, гемолитический и кардиотоксический; стрептолизин S, летальный и гемолитический
<i>Vibrio cholerae</i>	Холероген, летальный и энтеротоксический
Виды <i>Shigella</i>	Энтеротоксин
<i>Yersinia pestis</i>	Мышиный токсин

* Жирным шрифтом выделены экзотоксины, способные вызвать гибель человека.

7. Роль экзоферментов в патогенности микроорганизмов

Важными факторами патогенности следует считать экзоферменты (например, лецитиназа, гиалуронидаза, коллагеназа и др.), нарушающие гомеостаз клеток и тканей, что приводит к их повреждению. *Способность к образованию экзоферментов во многом определяет инвазивность бактерий — возможность проникать через слизистые оболочки, соединительнотканые и другие барьеры.* Например, гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав межклеточного вещества, что повышает проницаемость различных тканей. Этот фермент синтезируют бактерии родов *Clostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* и др. Нейраминидаза облегчает преодоление слоя слизи, проникновение внутрь клеток и распространение в межклеточных пространствах. Нейраминидазу

секретируют холерные вибрионы, дифтерийная палочка; он также входит в состав вируса гриппа. К этой же группе следует отнести и бактериальные ферменты, разлагающие антибиотики.

8. Изучение адгезивных свойств микроорганизмов

Приготовление суспензии микробных клеток для изучения их адгезивных свойств

Микробные культуры, выращенные на плотной питательной среде в чашках Петри, смывают 0,9% раствором хлорида натрия (5-6 мл на одну чашку Петри) с помощью шпателя. Готовят суспензию бактерий с концентрацией, соответствующей 1,0 усл. ед. оптической плотности (ОП) при длине волны проходящего света 540нм и рабочей длине кюветы 0,5см. Для измерения оптической плотности суспензии используют фотоколориметр КФК-2.

Приготовление суспензии эритроцитов для изучения их фиксирующей способности

Для получения эритроцитов используют венозную кровь человека или животных. Пробы крови у людей берут из локтевой вены, у животных из сердца (морские свинки, золотистые хомячки), хвостовой вены (свиньи, крысы), яремной вены (коровы, лошади, овцы), ретробульбарного венозного сплетения (белые мыши) или при декапитации (белые мыши, крысы). В качестве антикоагулянтов при взятии крови используют 3,8% раствор лимоннокислого натрия (1:10) или гепарин (3 ЕД на 1мл).

Можно использовать дефибринированную кровь. Для этого кровь набирают во флакон или пробирку, в которой находятся стерильные бусы и встряхивают в течение нескольких минут, для удаления фибрина из плазмы крови.

Отмывание эритроцитов проводят не позднее 18-24 часов от момента взятия крови (при этом кровь хранят в холодильнике при температуре плюс 4°С).

Эритроциты трехкратно отмывают десятикратным объемом 0,9% раствора хлорида натрия путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5мин и ресуспендируют в этом же растворе. Их конечную концентрацию доводят до $1,0 \times 10^{12}$ /л. Подсчет количества эритроцитов проводят в счетной камере Горяева.

Оценка степени адгезии микроорганизмов фотоколориметрическим методом с эритроцитами человека и животных

Суть метода заключается в следующем. После инкубации суспензии, содержащей микроорганизмы и эритроциты, последние осаждают центрифугированием. Бактерии, прикрепившиеся к эритроцитам за время инкубации, после центрифугирования оказываются в осадке, а не прикрепившиеся - остаются в надосадочной жидкости. Количественное определение фиксированных на эритроцитах бактерий осуществляют с помощью фотоколориметра путем измерения оптической плотности надосадочной жидкости.

Для оценки адгезивных свойств микроорганизмов в качестве модели эпителиальных клеток используют эритроциты крови человека и животных. В качестве контроля используют суспензии микроорганизмов и суспензии эритроцитов в изотоническом растворе хлористого натрия.

Суспензию микроорганизмов с эритроцитами, а также отдельно контрольные суспензии микроорганизмов и эритроцитов, инкубируют 30 минут при температуре 37⁰С на вращающейся платформе и центрифугируют в течение 2-3 минут при 1000об/мин. Пипеткой аккуратно отбирают надосадочную жидкость в количестве 2 мл и измеряют ее оптическую плотность на фотоэлектроколориметре. Расчеты производят по формуле:

$$ПА = (D_{к1} + D_{к2} - D_{опыт}) / D_{к1} \cdot 100\%$$

где ПА - показатель адгезии,

$D_{к1}$ – оптическая плотность надосадочной жидкости в контрольной пробе (микроорганизмы без эритроцитов);

$D_{к2}$ - оптическая плотность надосадочной жидкости в контрольной пробе №2 (эритроциты без микроорганизмов);

$D_{оп}$ - оптическая плотность надосадочной жидкости в опытной пробе.

Определение адгезивно - активных колоний бактерий методом С.С.Гизатулиной

Культуру исследуемых микроорганизмов рассеивают на плотную питательную среду для получения отдельных изолированных колоний. На поверхность выросших колоний наносят суспензию эритроцитов человека

или животных. Через 5 минут инкубации при температуре 37⁰С колонии просматривают с помощью лупы или при малом увеличении микроскопа.

Реакцию оценивают как положительную, если вокруг колоний образовывался плотный ореол прикрепленных к ее краю эритроцитов. Резко положительной считают реакцию, в которой наблюдается прикрепление к колониям большого количества эритроцитов, прикрывающих всю ее поверхность с образованием на ней скоплений агглютината и яркого ореола вокруг нее. Отсутствие ореола из прикрепленных к колонии эритроцитов говорит об отрицательной реакции.

Однако надо отметить, что данный метод не всегда может быть объективным, так как никаких количественных показателей он не учитывает и ориентирован только на глаз исследователя (субъективная оценка результатов исследования).

Изучение адгезивной способности микроорганизмов в препарате «раздавленная капля» с эритроцитами человека и животных

Для приготовления препарата «раздавленная капля» используют смесь суспензий эритроцитов и исследуемых микроорганизмов. Каплю смеси наносят на предметное стекло, шлифованным стеклом равномерно распределяют каплю таким образом, чтобы жидкость не выходила за пределы покровного стекла, и отсутствовали пузырьки воздуха. Мазок просматривают под иммерсионным объективом светового микроскопа. Для оценки среднего показателя адгезии производят подсчет количества микробных клеток на поверхности 30 эритроцитов в разных полях зрения. При среднем показателе 5 и более бактерий на одном эритроците адгезивные свойства считают как выраженные, при показателе 3-4 бактерии-умеренные, 1-2 бактерии-слабые.

Определение адгезивных свойств микроорганизмов по методике В.И. Брилис

Данная методика включает окрашивание мазков, благодаря этому достигается наилучшая визуализация взаимодействия микробных клеток с эритроцитами.

Для исследования адгезивных свойств микроорганизмов данным методом используют взвеси микробных культур и суспензии эритроцитов.

На обезжиренное предметное стекло наносят по одной капле суспензии бактерий и эритроцитов и смешивают их. Стекло помещают в термостат на

30 минут при температуре 37⁰С. После высыхания мазка на воздухе фиксируют его над пламенем горелки и производят окраску генцианвиолетом в течение 2 минут.

Анализ мазков проводят под иммерсионным объективом в световом микроскопе. Результаты оценивают также как и в предыдущей методике.

9. Определение коагулазной и гиалуронидазной активностей микроорганизмов

Для определения наличия коагулазы исследуемую культуру микроорганизмов засевают в пробирки с цитратной плазмой кроличьей крови (10мл крови, полученной из сердца кролика и 1мл 5% раствора лимоннокислого натрия), разведенной физиологическим раствором в отношении 1 : 4. Микроорганизмы, обладающие коагулазной активностью, при температуре 37⁰С вызывают свертывание цитратной плазмы в течение 2—24 часов.

Многие патогенные микроорганизмы продуцируют фермент гиалуронидазу, который способен растворить гиалуроновую кислоту, входящую в состав соединительной ткани. Раствор гиалуроновой кислоты, необходимый для реакции, получают из свежих пупочных канатиков, и при добавлении нескольких капель разведенной уксусной кислоты образуется сгусток. Испытуемые культуры микроорганизмов засевают в пробирки, содержащие раствор гиалуроновой кислоты. Пробирки помещают в термостат при температуре 37⁰ С на 15 минут, а затем в ледяную баню на 2 минуты. Микроорганизмы, продуцирующие гиалуронидазу, в этих условиях расщепляют гиалуроновую кислоту. Внесение в пробирку уксусной кислоты не дает сгустка. Отсутствие сгустка, таким образом, является показателем положительной реакции, говорящей о способности исследуемых микроорганизмов продуцировать гиалуронидазу. Постановка опыта требует значительной подготовительной работы и точного учета количества компонентов, участвующих в реакции.