

*микробиологические методы
лабораторной диагностики
инфекционных заболеваний*

Микроскопический
метод

Микробиологи-
ческий метод

Молекулярно-
генетический

Иммунологический
(серологический и
аллергологический)

Биологически
й метод





*микробиологические
методы исследования
направлены на
диагностику
инфекционных заболеваний*



цель микробиологич

исследований: *установить*

факт

наличия или отсутствия

возбудителя инфекционных

заболеваний

в организме больного

или на объектах внешней среды



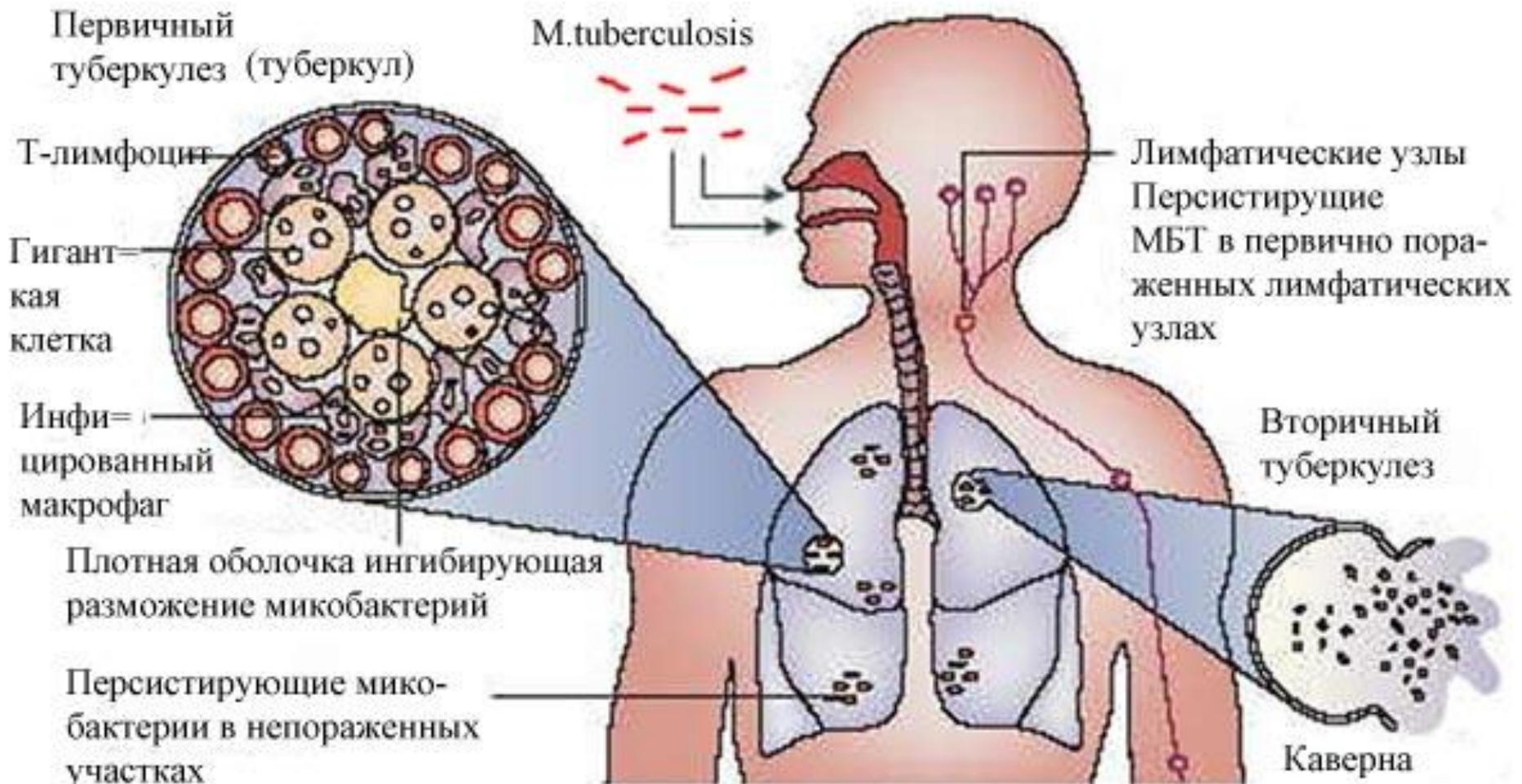
- задачи микробиологических исследований:**
- **обнаружить инфекционного агента в исследуемом материале**
 - **идентифицировать микробного агента**
 - **интерпретировать результаты исследования**

**основу микробиологической диагностики
составляет
правильный отбор биологического
материала
для исследования**



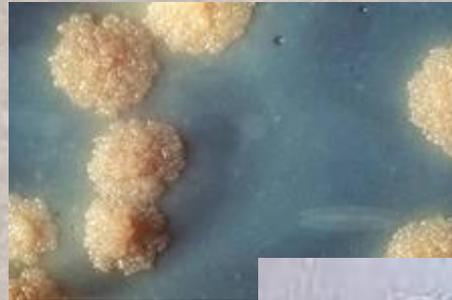
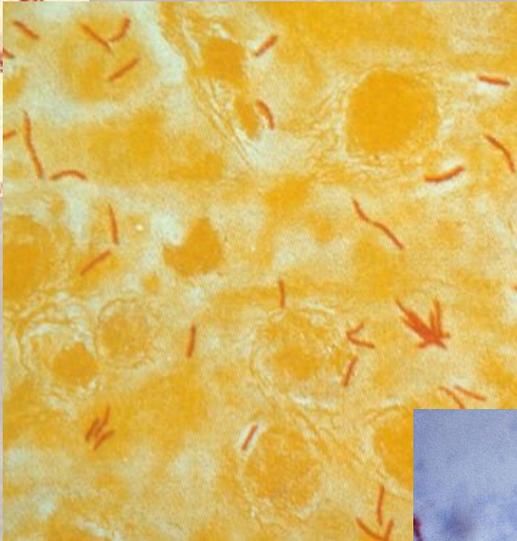
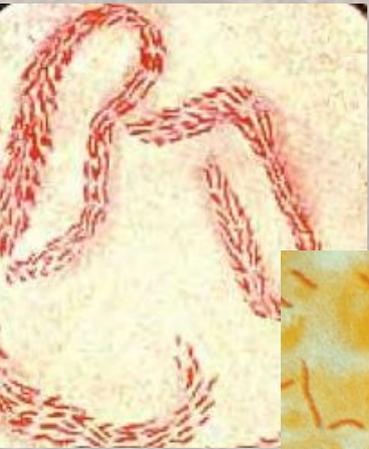
выбор материала для исследования должен соответствовать:

▶ патогенезу заболевания



выбор материала для исследования должен
соответствовать:

► биологическим свойствам возбудителя



выбор материала для исследования должен
соответствовать:

▶ эпидемиологии возбудителя



- клинический материал отбирают в соответствии с локализацией инфекции в организме больного (при поражениях отдельных органов и систем)



- при отсутствии клинически выраженного инфекционного поражения исследуют кровь, а затем отбирают образцы биологического материала с учётом клинической картины заболевания и доступности взятия материала для исследования



- образцы клинического материала забирают до начала антимикробной терапии с соблюдением правил асептики

МИНДРАВ РФ
Наименование учреждения _____
Лаборатория _____

Код формы по ОКЗД _____
Код учреждения по ОКЗД _____

Медицинские документы
Форма № 216/у
Утв. Минздравом СССР 04.10.80
№ 1030

АНАЛИЗ МОКРОТЫ № _____
14 февраля 2011 г. час. _____ мин.
дата взятия биоматериала

Фамилия, И.О. Иванов И.И. Возраст 44 года
Учреждение 23 ГКБ Отделение 3 хирургия
палата 333 участок _____ медицинская карта № 10000
Количество _____ Запах _____
Цвет _____ Характер _____
Примеси _____
Консистенция _____



общие требования к процедуре отбора и транспортировки:

- каждый клинический материал следует рассматривать как потенциально опасный, вследствие этого при заборе, транспортировке, хранении и работе с ним необходимо соблюдать правила биологической безопасности



общие требования к процедуре отбора и транспортировки:

- клинический материал следует забирать в объёме, достаточном для всего комплекса микробиологических исследований



общие требования к процедуре отбора и транспортировки:

- микробиологические исследования следует начинать немедленно после поступления образца в микробиологическую лабораторию



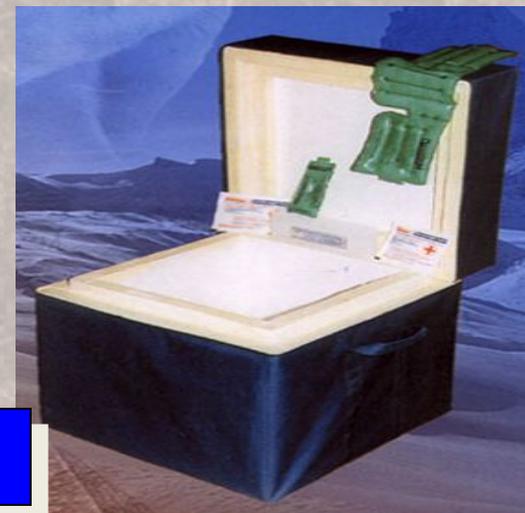
Требования к транспортировке

исследуемого материала
в лабораторию



▶ **своевременность
доставки**

▶ **неизменность образца**



термоконтейнер:

лед

ледяная вода

сухой лед

ИЛИ

+ 37°C



направление

Министерство здравоохранения
Наименование учреждения:

Областная клиническая больница
г. Иркутск, ул. Юбилейный 100.

Код формы по ОКУД
Код учреждения по ОКПО

Медицинская документация
Форма N 204/У
Утверждена Минздравом СССР
04.10.80 N 1030

Направление

на микробиологическое исследование

" _____ " _____ 20 _____ г. _____ час _____ мин _____

в _____ лабораторию

Ф.И.О. _____ возраст _____

Медицинская карта N _____

Отделение _____ палата _____

Диагноз, дата заболевания: _____

Показания к обследованию: больной, переболевший, реконвалесцент,
контактный, профилактическое обследование (подчеркнуть, вписать)

Материал: кровь, моча, мокрота, кал, дуоденальное содержимое,
пунктат, мазок, соскоб, раневое содержимое, гной, секционный материал,

Цель и наименование исследования: _____

(на какие инфекции исследовать)

Должность и фамилия лица, направляющего материал: _____

Результат исследования № _____

При исследовании _____

(наименование материала)

Дата выдачи: " _____ " _____ 20 _____ г. Подпись _____

*микробиологические
методы
исследования:■*

микробиологические методы исследования

направлены на:

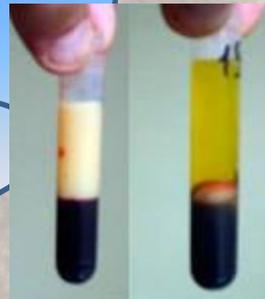
прямое обнаружение возбудителя
инфекционного заболевания
в клиническом материале обследуемого

косвенное определение возбудителя
инфекционного заболевания
в клиническом материале обследуемого



клинический материал

адекватный метод
исследования



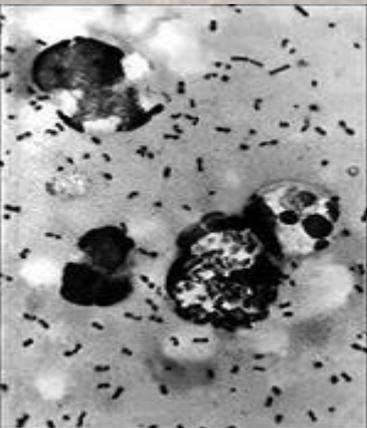
прямое обнаружение возбудителя
инфекционного заболевания
в клиническом материале
обследуемого:

микроскопический метод

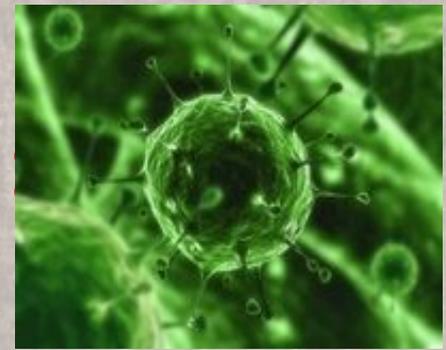
культуральный метод

экспресс методы

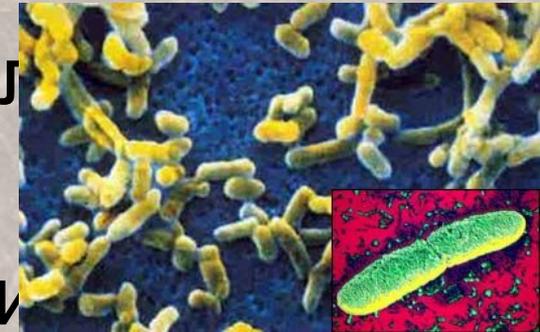
микроскопический метод это самостоятельный метод исследования, позволяющий определить в клиническом материале обследуемого возбудителя инфекционного заболевания на основе **морфологических особенностей микробной клетки**



Задачи микроскопии



- выявление возбудителя в клиническом материале
- идентификация на основе определения характерных морфологических и тинкториальных признаков микроорганизмов
- изучение окрашенных мазков и колоний чистых культур.



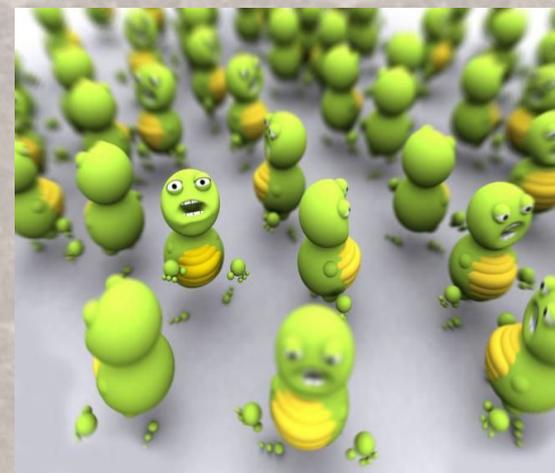
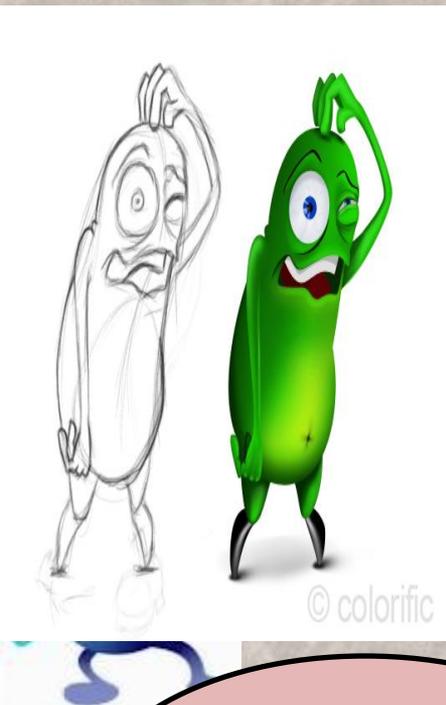
Морфология

Специальное
расположение
клетки в мазке

Микро-
организмы

Тинкториальн
ые свойства

Наличие
специфических
органовидов



Простые методы окраски микроорганизмов



Сложные методы окраски микроорганизмов



Дифференцирование
одних видов от
других

Метод Грама

Метод Циль-
Нильсона

Отличие Г+ от Г-
бактерий

Метод Романовского-Гимзы

Отличие
кислотоустойчивых от
кислотонеустойчивых

Дифференцирование
микроорганизмов
(спирохет)

Выявление
нуклеотида

Обнаружение
простейших

Изучение
структуры
микроорганизмо
В

Метод Ожешко

Метод Леффлера

Метод Нейссера

Метод Гинса

Выявление
спор

Выявление зерен

Выявление
капсул

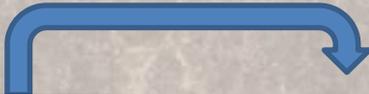
Выявление
жгутиков



микроскопический метод включает:

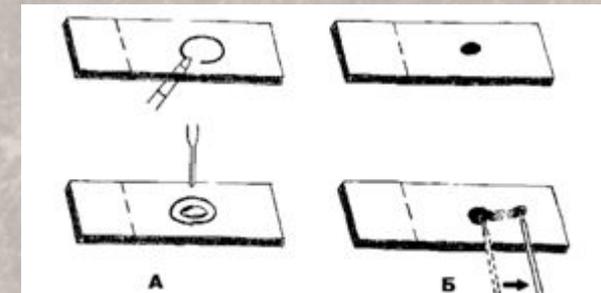
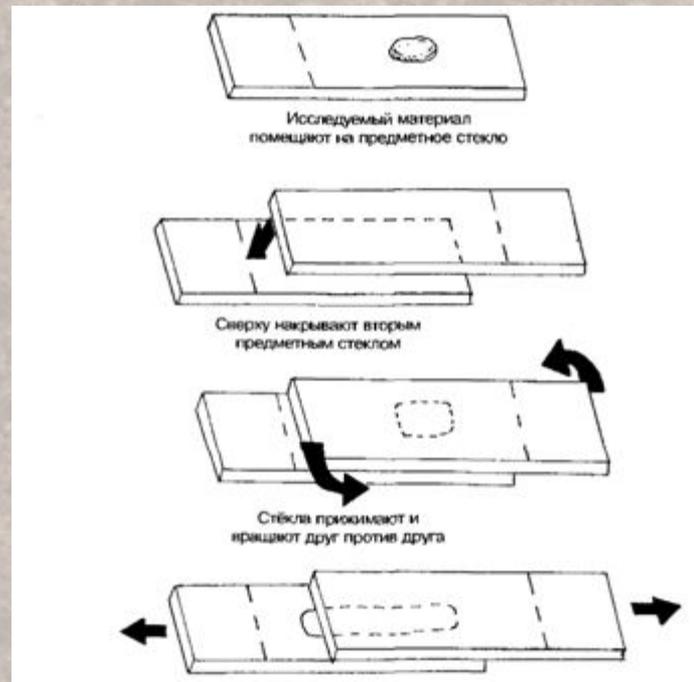
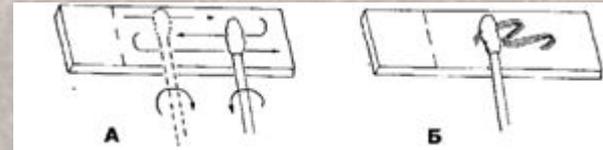
I ЭТАП

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКА-ПРЕПАРАТА
для определения в нем
инфекционного агента



исследуемый
материал

(вид мазка зависит
от клинического
материала)



виды мазков

► *нативный мазок*

► *фиксированный мазок*



исследуемый материал

(вид мазка зависит от цели исследования)

«*раздавленная*»
капля

«*висячая*»
капля»

мазок-отпечаток

фиксированный мазок

**нативные препараты
готовят для исследования
живых неокрашенных
бактерий**

**прижизненное определение
микробов проводят
при микроскопии
в темном поле или фазово-
контрастным методом**



для приготовления фиксированных
препаратов в зависимости от клинического
материала используют разные методы
фиксации мазка

фиксация



Химическая

мазки погружают на 5-20 мин.

- ▶ в метиловый
- ▶ этиловый спирт
- ▶ смесь Никифорова
- ▶ сулемовый спирт
- ▶ другие фиксирующие жидкости

Физическая

мазки фламбируют через
пламя спиртовки 3 раза

II ЭТАП

ОКРАШИВАНИЕ ПРЕПАРАТА

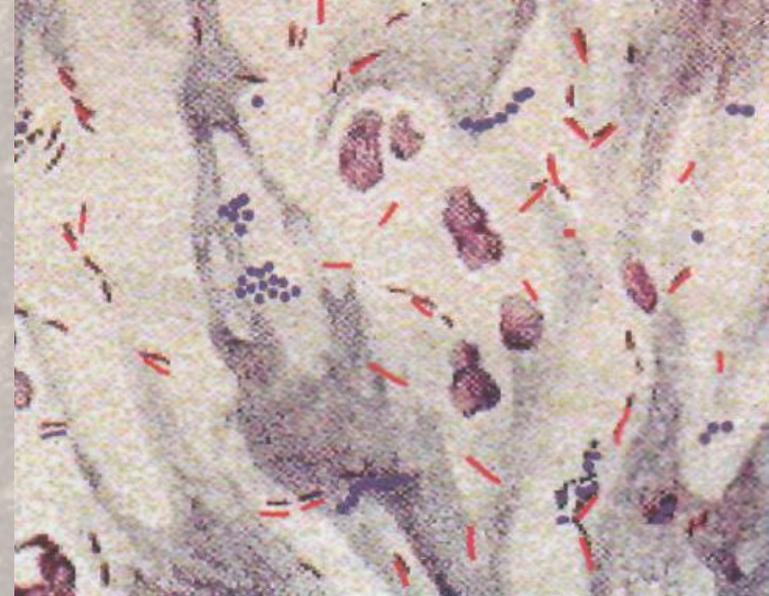
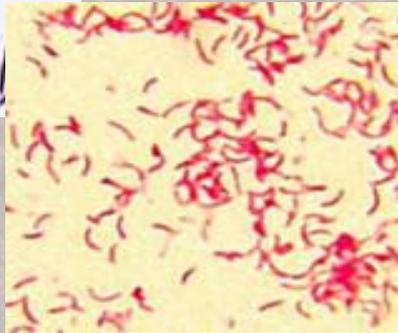
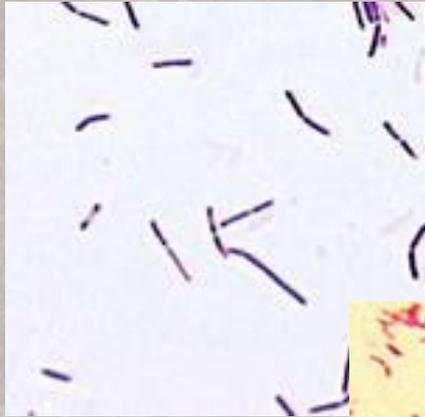
*простой
метод*

**СЛОЖНЫЙ
МЕТОД**

*(в зависимости от цели
исследования)*

дифференцирующие методы:

(позволяют выявить тинкториальные свойства микробов)



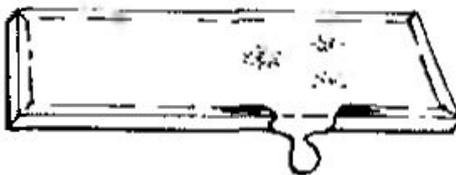
- метод Грама
- метод Циля – Нильсена
- метод Романовского-Гимзе

Окраска по Граму

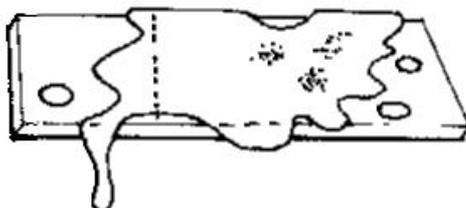
1. Фиксировать мазок на пламени
2. Окрашивать раствором кристаллического фиолетового в течение 1 мин
3. Промыть водой. Не промокать



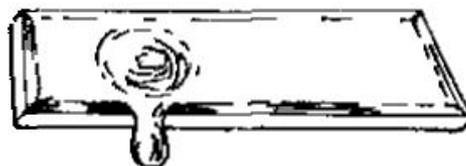
4. Окрашивать раствором Люголя в течение 1 мин
5. Промыть водой. Не промокать



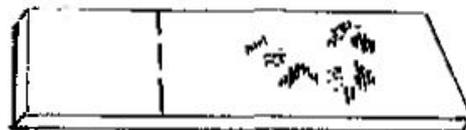
6. Обесцветить в течение 10-30 с в смеси ацетона (30 мл) с этанолом (70 мл) при лёгком покачивании
7. Промыть водой. Не промокать



8. Окрашивать основным фуксином в течение 10-30 с



9. Промыть водой и высушить на воздухе



Окраска по Цилю-Нильсену

1. Фиксировать мазок на пламени
2. Окрашивать карболфуксином, нагревая на пламени спиртовки в течение 5 мин (или 20 мин на водяной бане)
3. Промыть водой

4. Обесцветить в смеси спирта-кислота до сохранения слабо-розовой окраски

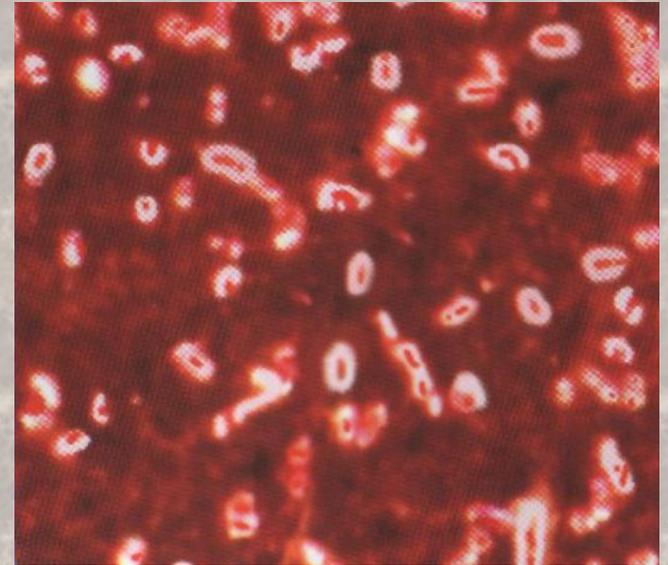
5. Промыть водой

6. Дополнительно окрашивать метиленовым синим (или метиленовым синим Лёффлера) в течение 10-30 с

7. Промыть водой и высушить на воздухе

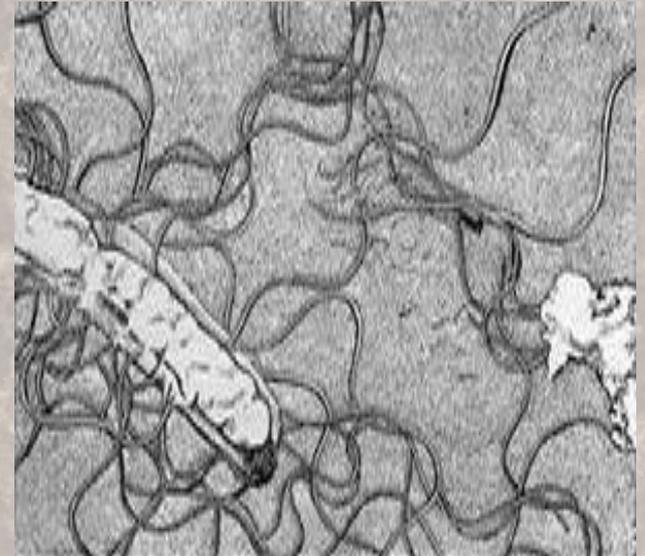
специальные методы окраски применяют для окрашивания различных морфологических структур:

окраска по Бурри-Гинсу для обнаружения капсул
на темном фоне препарата контрастно выделяются неокрашенные капсулы, внутри которых находятся бактерии ярко-малинового цвета

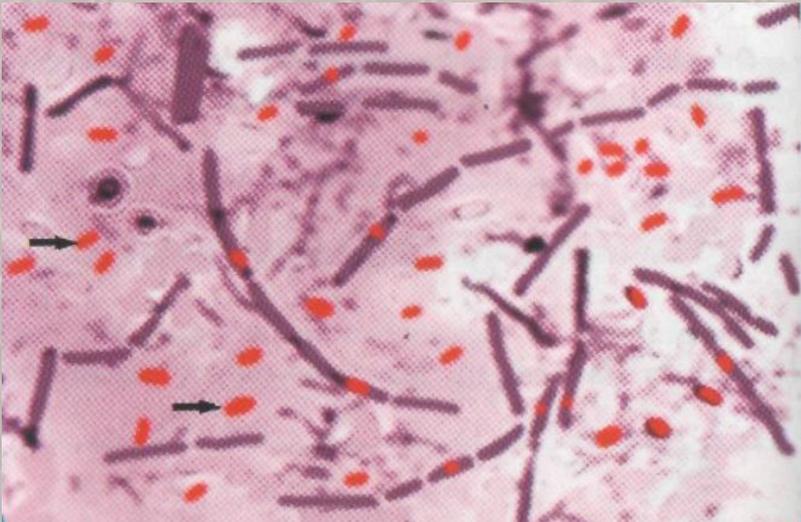


мазок из чистой культуры
Klebsiella pneumoniae

**для обнаружения
жгутиков используют
прямой метод
Леффлера
или темнопольную и
фазово-контрастную
микроскопию**



метод Ожешко позволяет обнаружить споры



**споры *B. anthracis*,
окрашены в рубиново-
красный цвет, палочки
– в фиолетовый**

III ЭТАП

МИКРОСКОПИЯ ПРЕПАРАТА



МИКРОСКОПИЯ В микробиологии

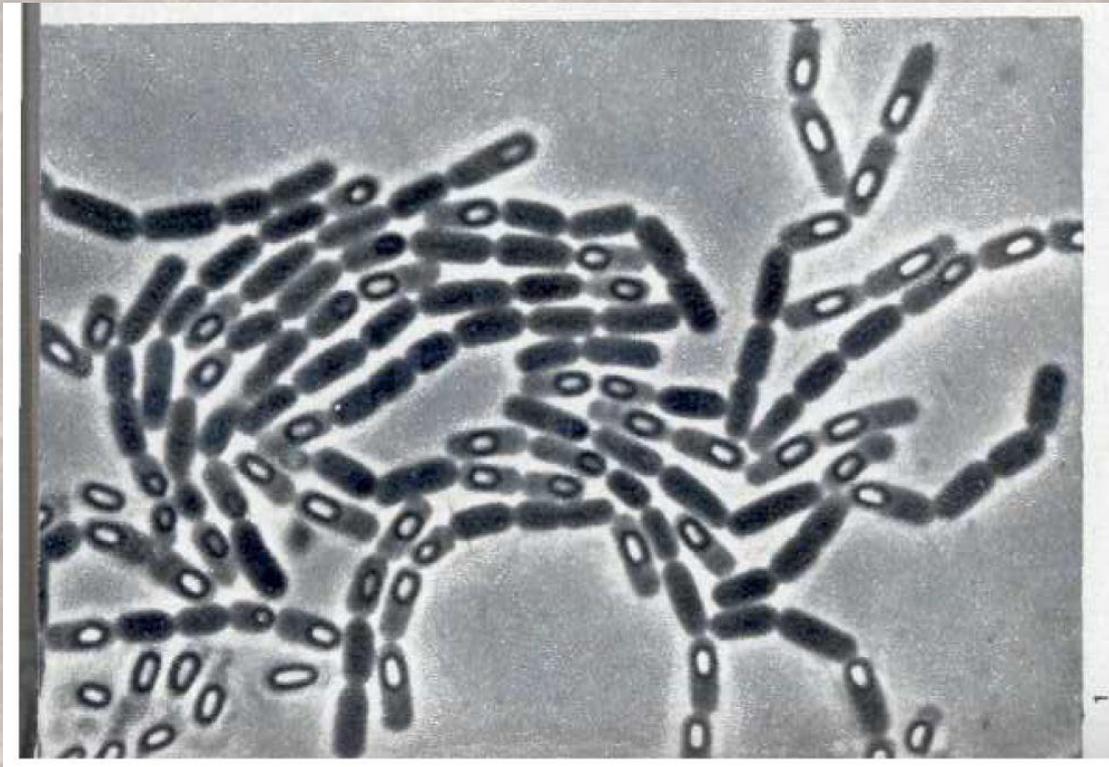
световая

электронная

сканирующая
зондовая

IV ЭТАП

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИССЛЕДОВАНИЯ



**эффективность обнаружения
микроорганизмов в мазке-препарате
определяется степенью
обсемененности им исследуемого
материала: если при обсемененности:**

> 10^6 кл/мл –

**обнаружение микроорганизмов не
встречает затруднений**

10^4 кл/мл

**обнаружение становится трудно
разрешимой задачей**

< 10^3 кл/мл

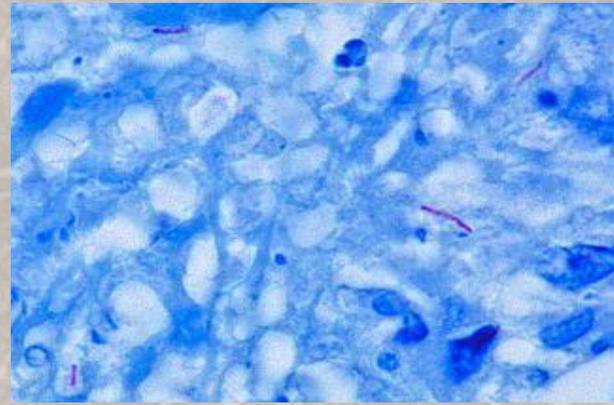
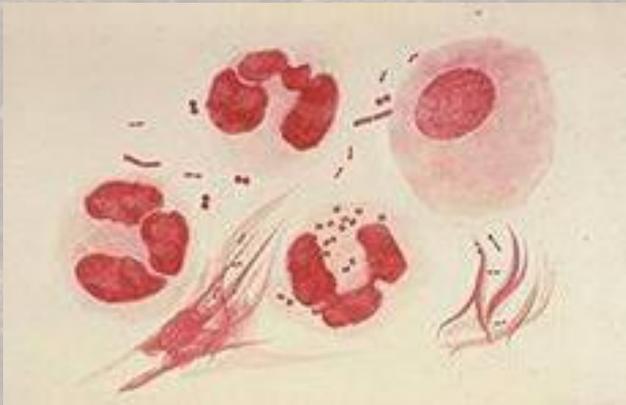
обнаружение фактически неразрешимо

идентификационные
критерии
микроскопического метода

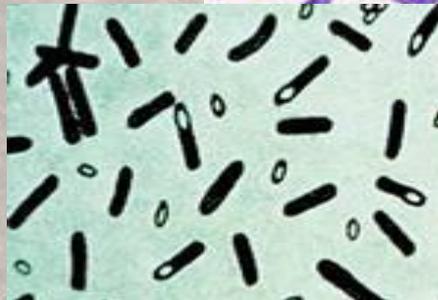
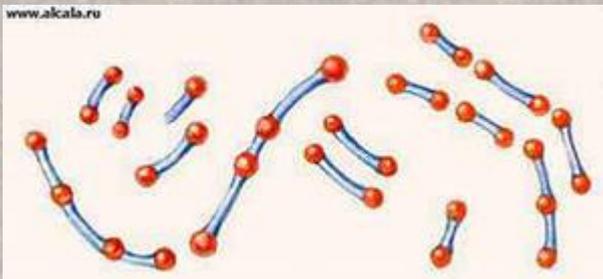
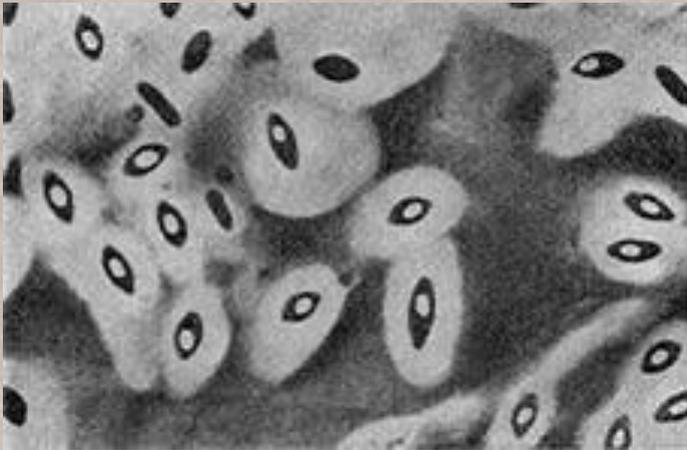


морфологические особенности микробной клетки возбудителя к числу которых относятся

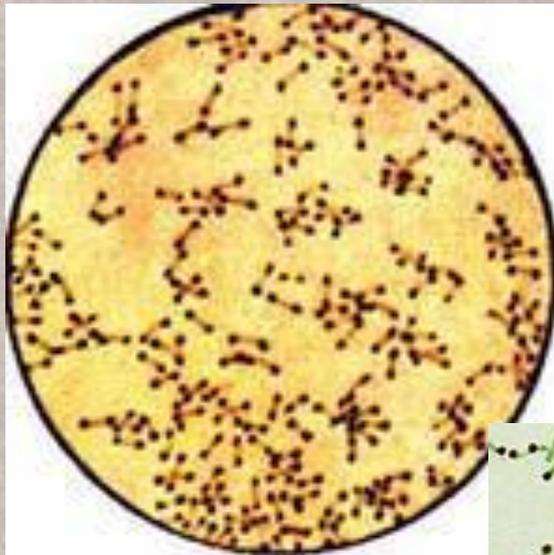
▶ специфическая форма
микробной клетки



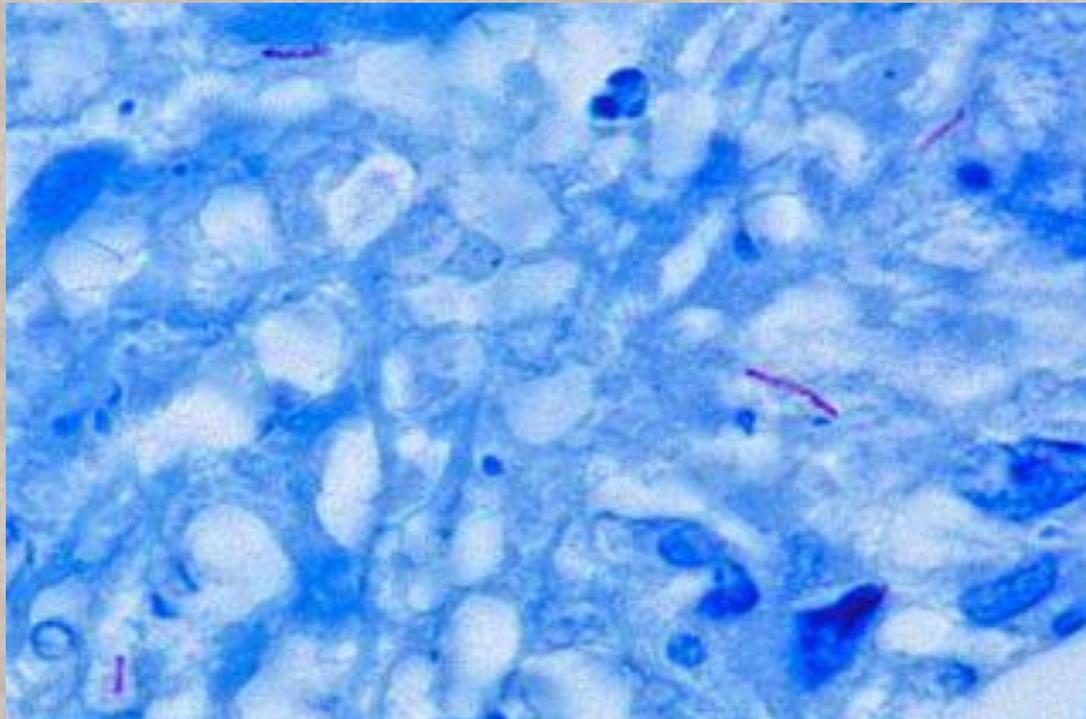
▶ наличие необязательных органоидов в структуре микробной клетки



► специфическое расположение
микробных клеток
в мазке



▶ тинкториальные свойства



Пример:

возбудитель сифилиса
(серонегативный период)



фиксированный мазок



окраска по Романовскому-Гимзе
- тинкториальные свойства

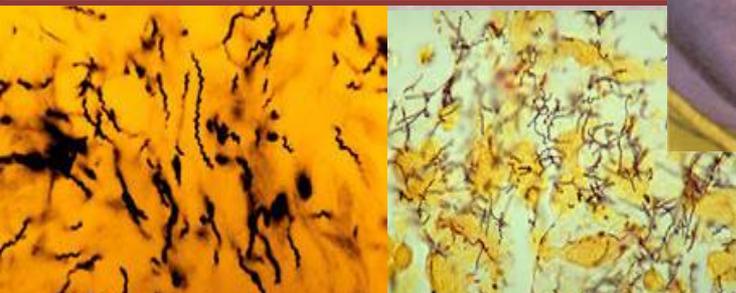


мазок висячая или
раздавленная капля



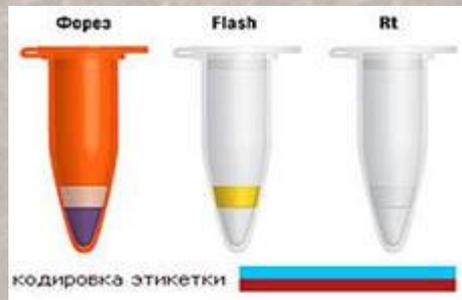
микроскопия в темном
поле – специфическое
движение

фиксированный мазок



серебрение по Морозову
- количество завитков

**культуральный метод исследования –
метод выделения чистой культуры
возбудителя и ее идентификация на
основе комплекса
его биологических свойств**



культуральный метод является «ЗОЛОТЫМ СТАНДАРТОМ» и составляет один из основных видов работы микробиологической лаборатории



Задачи культурального метода исследований

1. Идентифицировать микроорганизмы в исследуемом материале

2. Определить их видовую принадлежность

3. Установить чувствительность к антимикробным препаратам (АМП)



по морфологическим, тинкториальным, биохимическим, токсигенным, антигенным и культуральным свойствам



- При микробиологической диагностике заболеваний, вызванных условно-патогенными микробами, представителями нормальной микрофлоры, обязательным является определение **количества возбудителей** в исследуемом материале.

Применение культурального метода

клиническая
медицина



Диагностика
инфекционных
заболеваний

эпидемиология

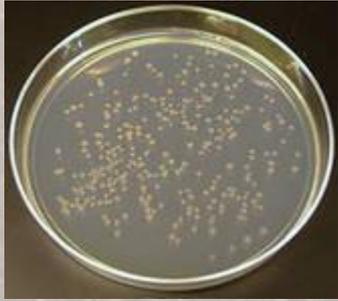


определение
микробоносительства и
выявление источника
инфекции

санитарная
микробиология



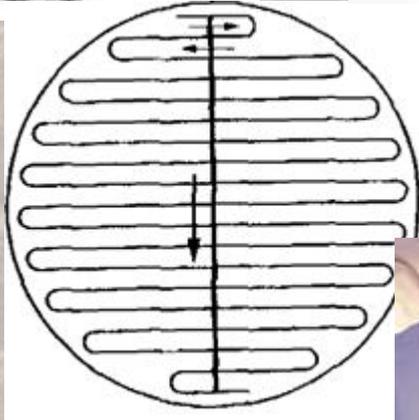
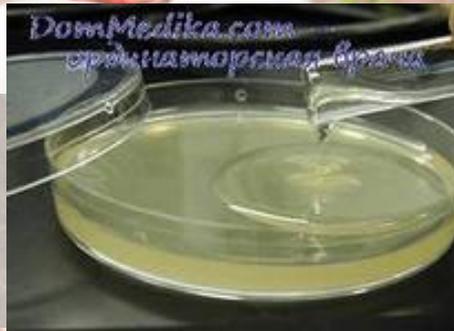
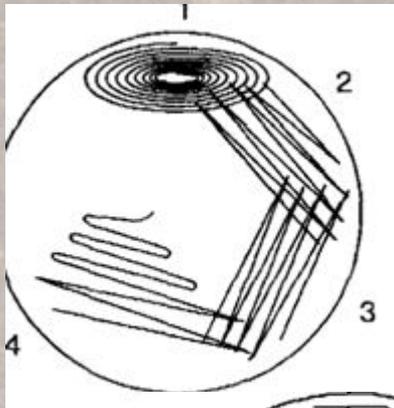
определение патогенных
микроорганизмов во
внешней среде и
определение санитарного
состояния объектов
внешней среды



**алгоритм
культурального
метода
исследования:**

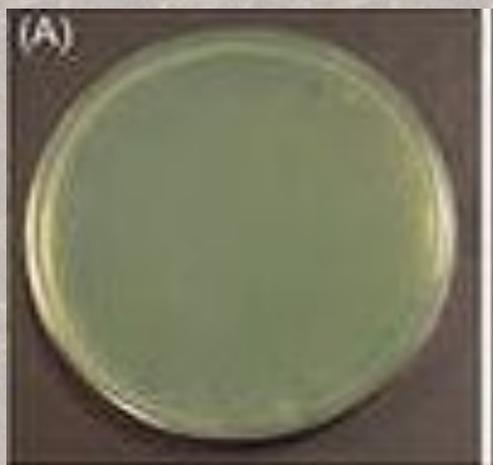
I ЭТАП

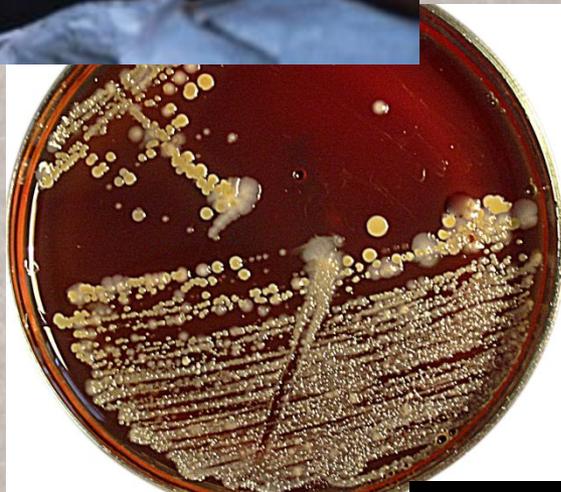
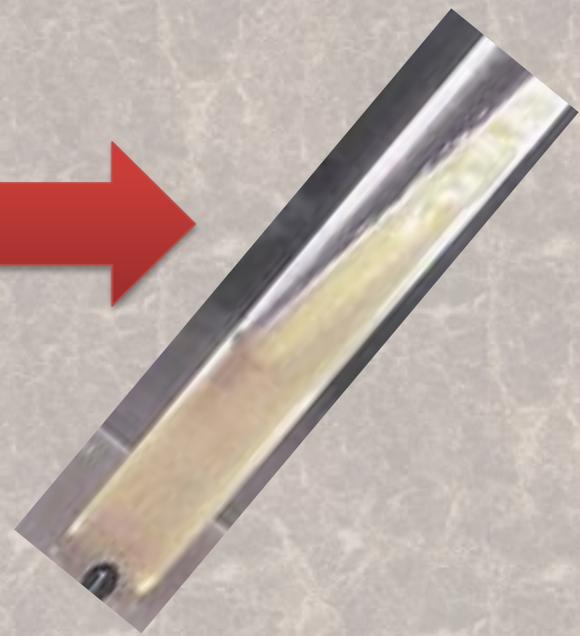
посев исследуемого материала
для выделения чистой культуры



II ЭТАП

накопление и выделение чистой культур





III ЭТАП

постановка идентификационных тестов с целью дифференцирования инфекционного агента



ID32 C

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | A | B | C | D | E | F |
| GAL | ACT | SAC | NAG | LAT | ARA | CEL | RAF | MAL | TRE | 2KG | MDG | MAN | LAC | INO | 0 |
| SOR | XYL | RIB | GLY | RHA | PLE | ERY | MEL | GRT | MLZ | GNT | LVT | GLU | SBE | GLN | ESC |

REF. : _____
Origine/ Source/ Herkunft/ Origen/ Prelievo _____

Temps d'incubation
Incubation Time 24 H/ St
Inkubationszeit 48 H/ St

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | A | B |
| GAL | ACT | SAC | NAG | LAT | ARA | CEL | RAF | MAL | TRE | 2KG | MDG |
| SOR | XYL | RIB | GLY | RHA | PLE | ERY | MEL | GRT | MLZ | GNT | LVT |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | A | B | C | D | E | F |
| GAL | ACT | SAC | NAG | LAT | ARA | CEL | RAF | MAL | TRE | 2KG | MDG | MAN | LAC | INO | 0 |
| SOR | XYL | RIB | GLY | RHA | PLE | ERY | MEL | GRT | MLZ | GNT | LVT | GLU | SBE | GLN | ESC |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 |

Autres tests/ Other tests/ Weitere Tests/ Altri tests/ Otros tests

Ident. _____

BIO MÉRIEUX SA / 69280 Marcy-l'Étoile / France

41011 B

IV ЭТАП

определение комплекса биологических свойств выделенной культуры

с целью ее идентификации



морфология
микробной клетки

культуральные
свойства

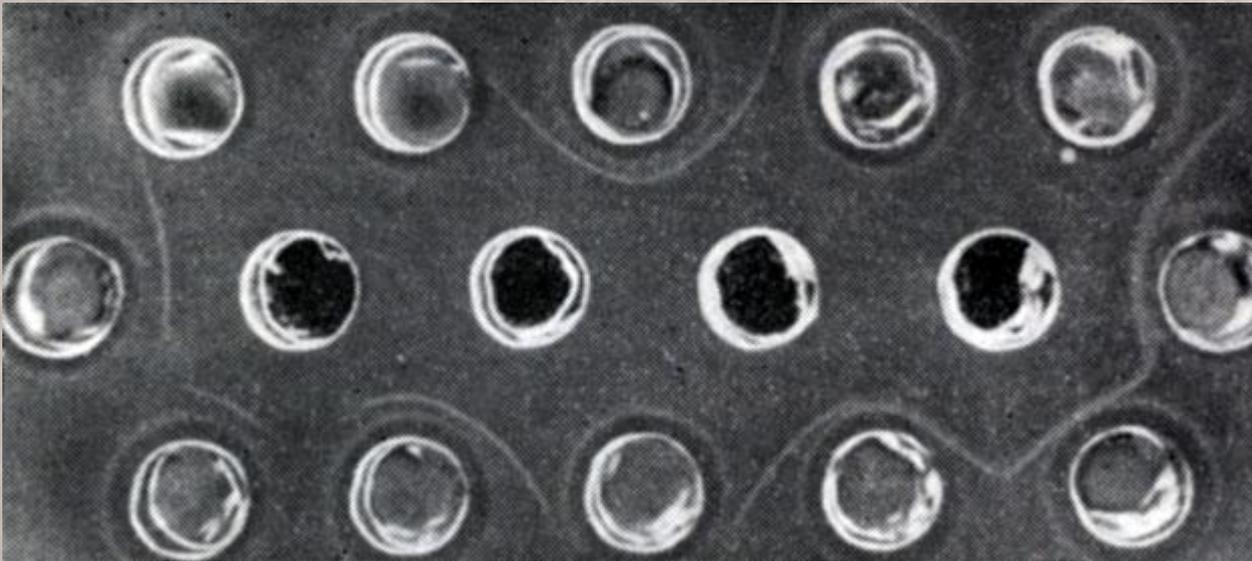
биохимические
свойства

тинкториальные
свойства
микробной клетки



IV ЭТАП

определение комплекса
биологических свойств выделенной
культуры
с целью ее идентификации



разрешающая способность метода

▶ повышенные требования
к транспортировке и хранению
клинического материала

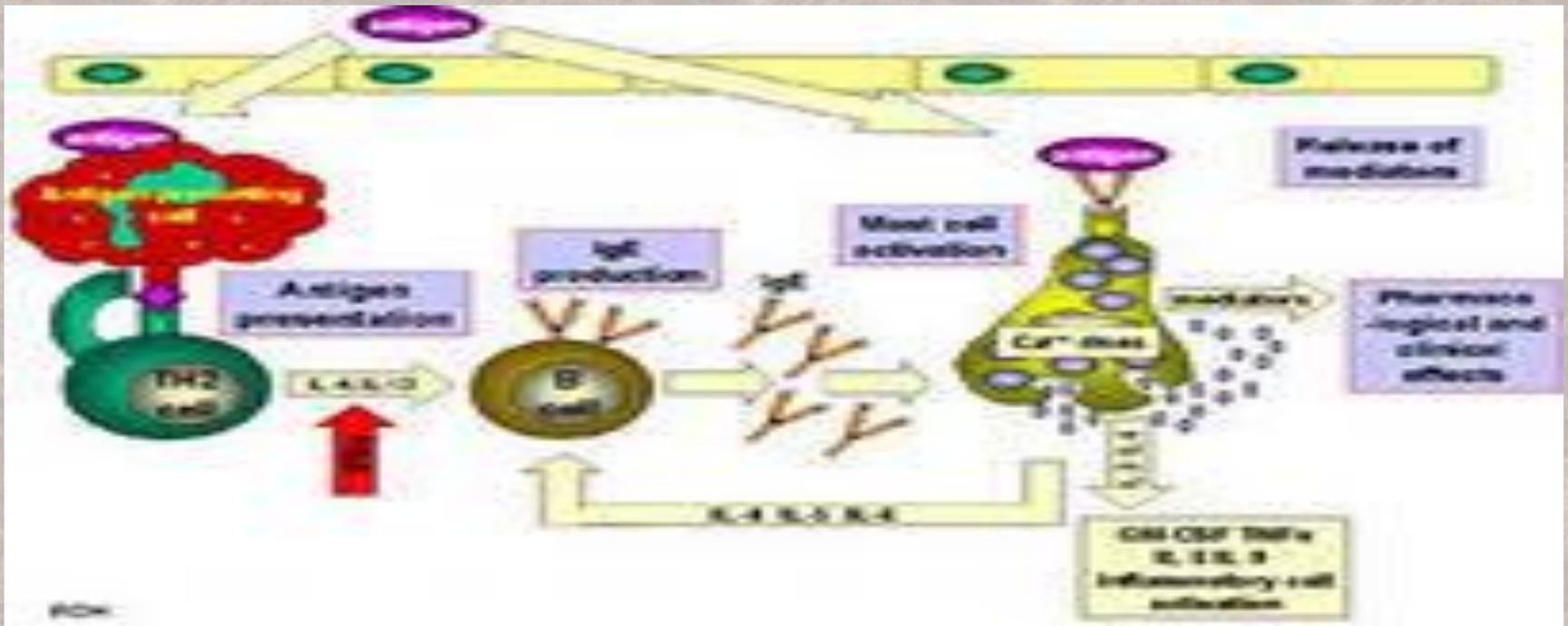
▶ длительные сроки
культивирования
микроорганизмов

▶ не все виды микроорганизмов
можно культивировать
in vitro

непрямое обнаружение возбудителя
инфекционного заболевания
в клиническом материале
обследуемого:

иммунологический метод

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД - ЭТО МЕТОД
КОСВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ИНФЕКЦИОННОГО АГЕНТА НА ОСНОВЕ
ОТВЕТНОЙ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА
НА ЕГО ПРИСУТСТВИЕ



ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ВКЛЮЧАЕТ:



метод серодиагностики
(in vitro и in vivo)

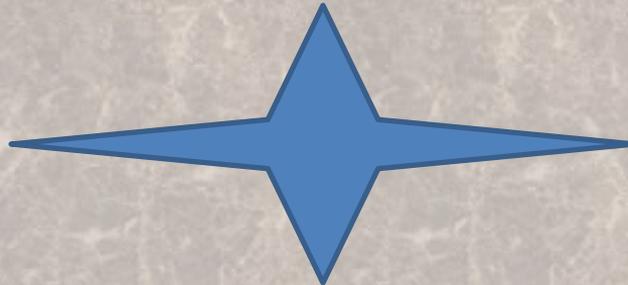
аллергический метод
(in vivo)

МЕТОД СЕРОДИАГНОСТИКИ -

заключается в определении титра специфических антител в сыворотке больного. Для его реализации используют различные реакции иммунитета, как простые (агглютинация и ее разновидности), так и сложные (РСК, ИФА и др.).

МЕТОД СЕРОДИАГНОСТИКИ

in vitro



in vivo

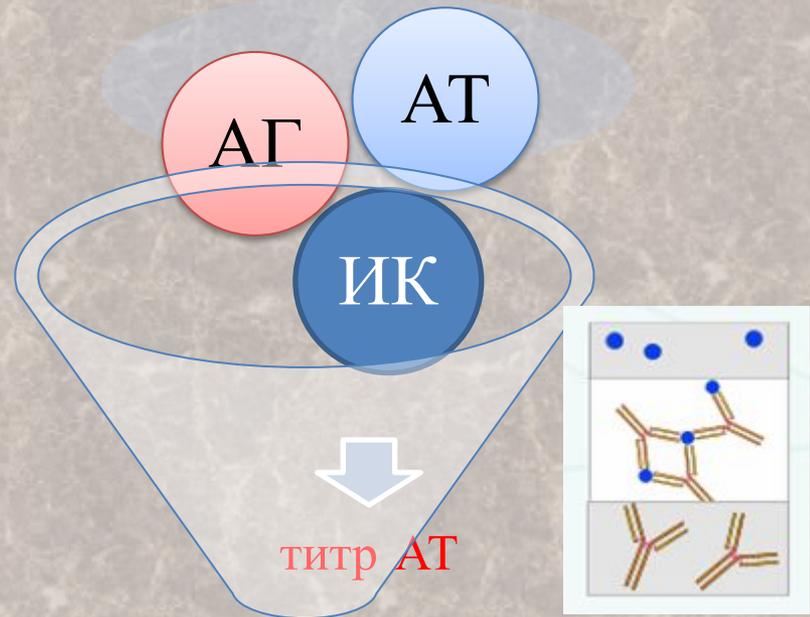
МЕТОД СЕРОДИАГНОСТИКИ

in vitro



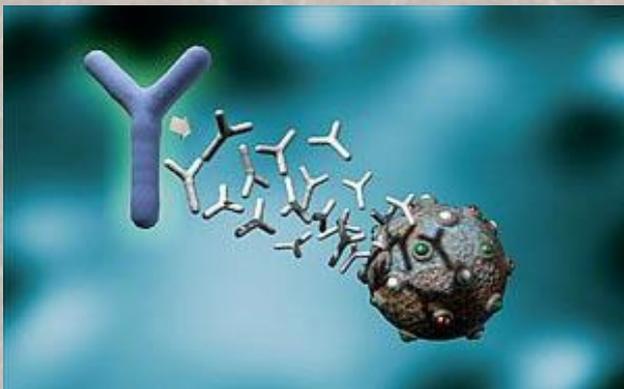
исследуемый материал

- сыворотка крови



Сыворотка наливается в ряд пробирок и разводится физиологическим раствором в разных разведениях. Затем в каждую пробирку добавляется стандартный, известный **антиген, микроб или вирус (диагностикум)**. Смотрят, в каком из наибольших разведений мутнеет сыворотка – это и будет **титр реакции** для данного больного.

Чем титр больше, тем больше вероятность заболевания. Поэтому говорят о **диагностически значимых титрах** для болезни, потому что более низкие титры могут просто говорить о случайной встрече человека с данным микробом, но без болезни.

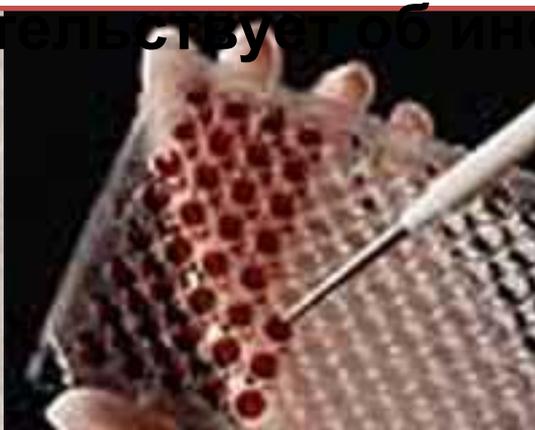


Для обнаружения антитела к исследуемой сыворотке прибавляют известный антиген. Эти препараты, называемые **диагностикумами**, представляют собой взвесь убитых микроорганизмов (их отдельных антигенов) или эритроцитов (частиц латекса), на которых адсорбированы микроорганизмы или их антигены.

Классическая серодиагностика основана на:

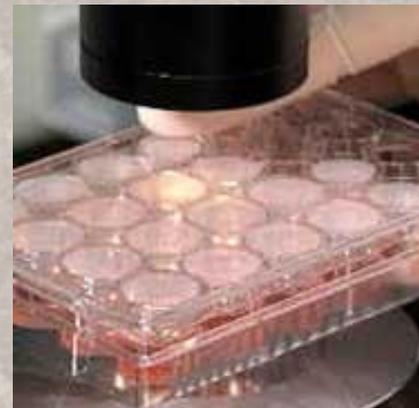
- 1). Определении антител к возбудителю в **диагностическом титре**;
- 2). Обнаружение в исследуемой сыворотке крови антител к возбудителю ряда инфекционных болезней **недостаточно** для постановки диагноза, поскольку оно может отражать наличие постинфекционного или поствакцинального иммунитета. Именно поэтому исследуют парные сыворотки больного, взятые в первые дни болезни и через 7-10 дней (иногда этот интервал может быть более длительным). В этом случае оценивают нарастание титра антител.

Нарастание титра антител в 4 раза и более свидетельствует об инфекционной природе антител.



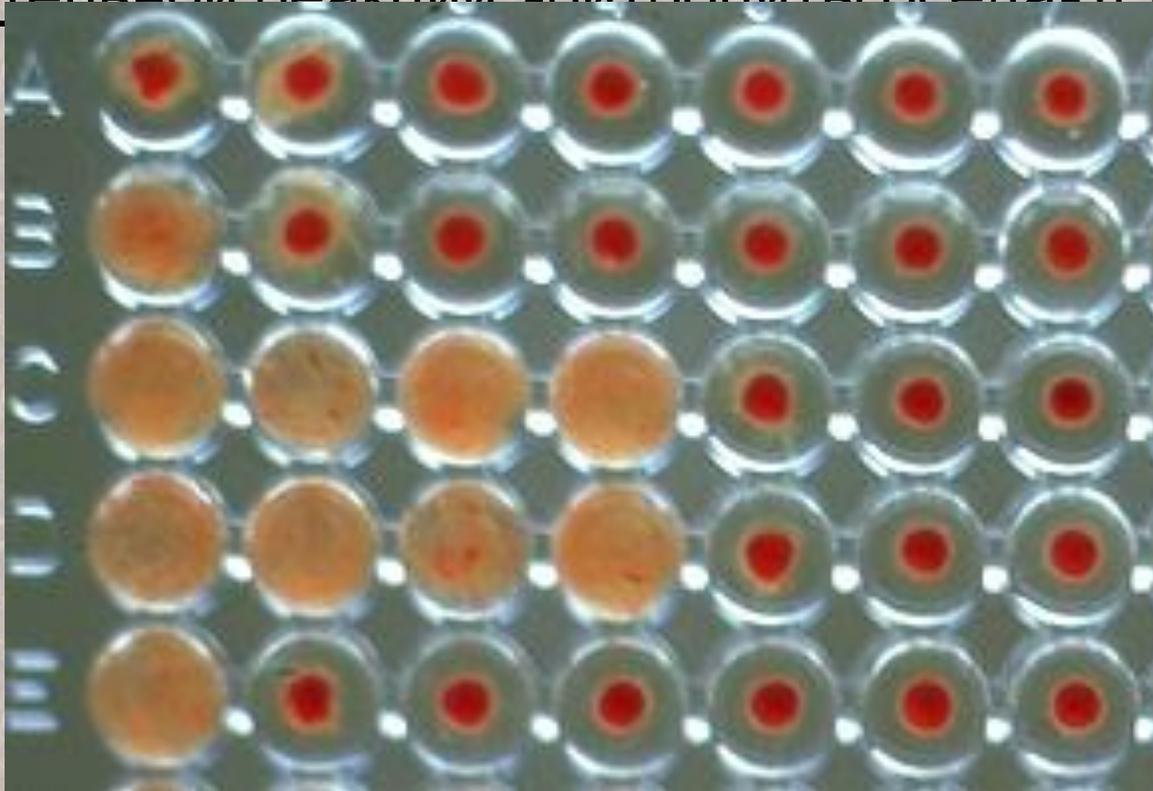
3) При экзотических инфекционных болезнях, а также при гепатитах, ВИЧ-инфекции и при некоторых других заболеваниях сам факт определения антител свидетельствует об инфицированности пациента и имеет диагностическое значение.

Серологический метод диагностики **применяют с конца первой-начала второй недели** заболевания.



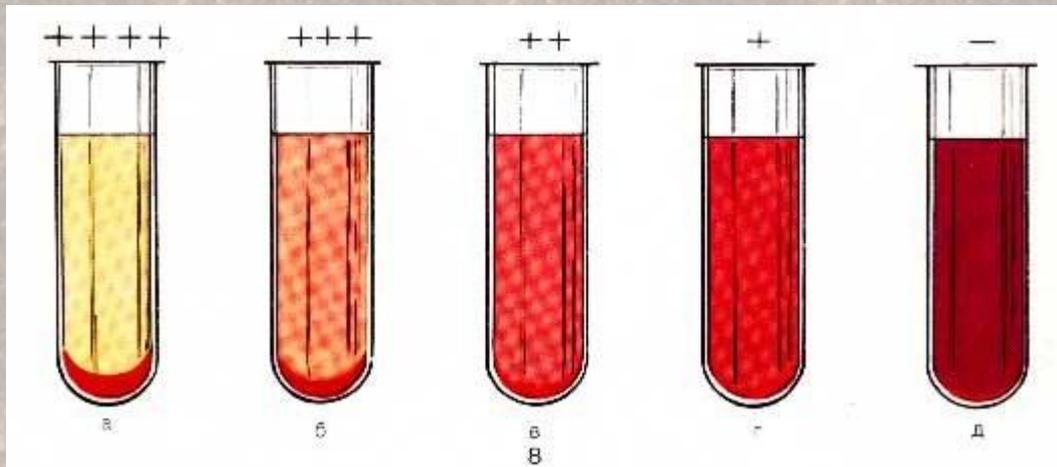
Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА, РПГА) основана на использовании эритроцитов с адсорбированными на их поверхности антигенами, взаимодействие которых с соответствующими антителами сыворотки крови больных вызывает **склеивание и выпадение эритроцитов на дно пробирки в виде фестончатого осадка.**

При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде «пуговики».

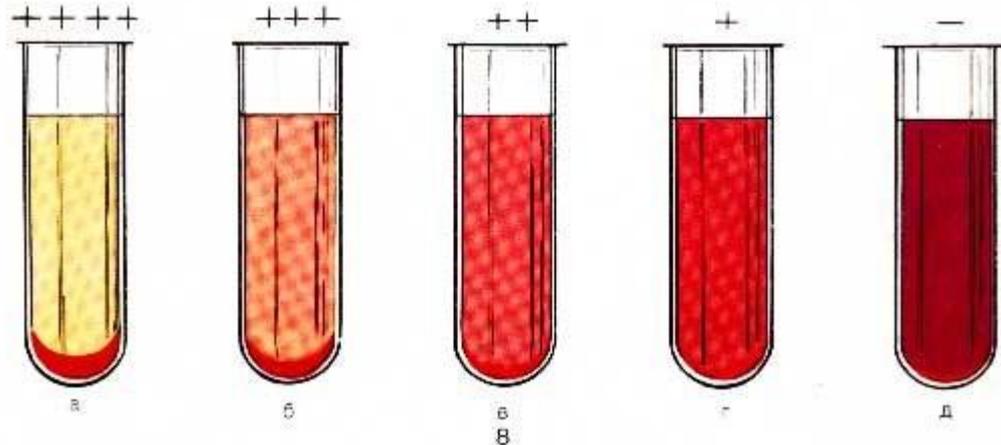
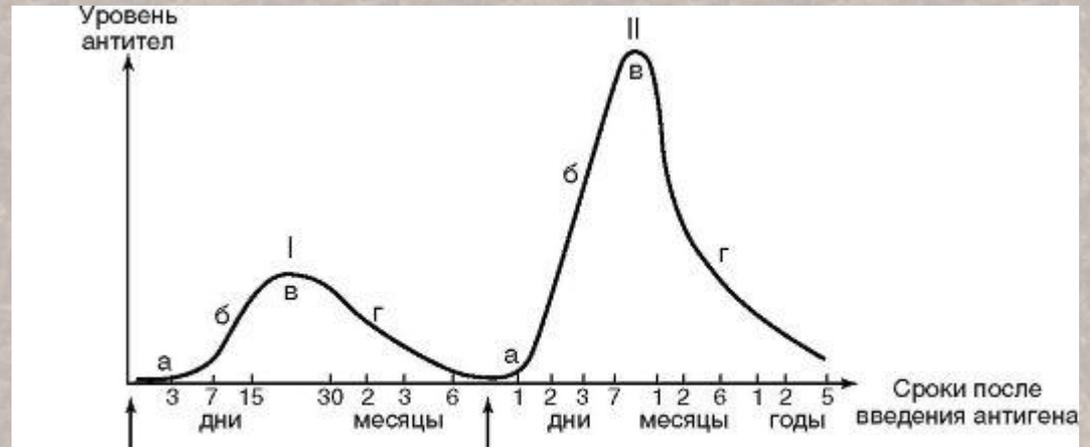


критерии этиологической значимости инфекционного агента в методе серодиагностики

▶ **диагностический титр**



▶ динамика антителообразования в парных сыворотках



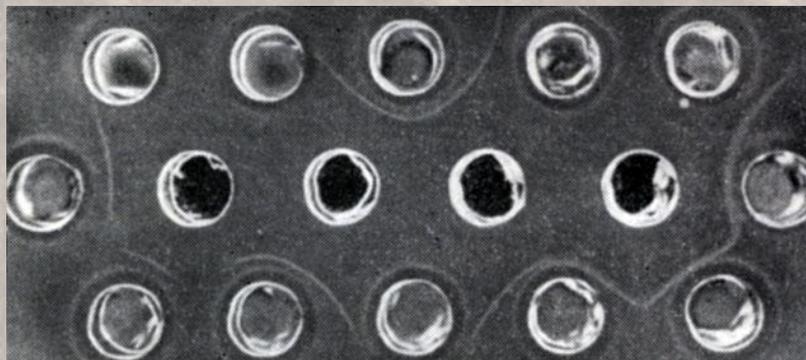
▶ циркуляция в крови
иммуноглобулинов
разных классов

Ig G 1:400

Ig M -

Ig G 1:200

Ig M 1:400



МЕТОД СЕРОДИАГНОСТИКИ/

Аллергометод

in vivo

наличие **АТ** в сыворотки крови
обследуемого



проба Шика

проба Дика

наличие **t-сенсibilизированных лимфоцитов** к АГ в
сыворотки крови обследуемого



проба Манту

Собственно-иммунный метод

Цель: **поиск антигенов** микробов в патологическом материале с помощью серологических иммунных реакций

Реакция агглютинации

В реакции агглютинации (РА) антиген участвует в виде корпускулярной частицы. Это могут быть суспензии микроорганизмов, клеток организма, например эритроцитов. При смешивании со специфической сывороткой происходит склеивание и оседание визуально различимых хлопьев — иммунных комплексов.

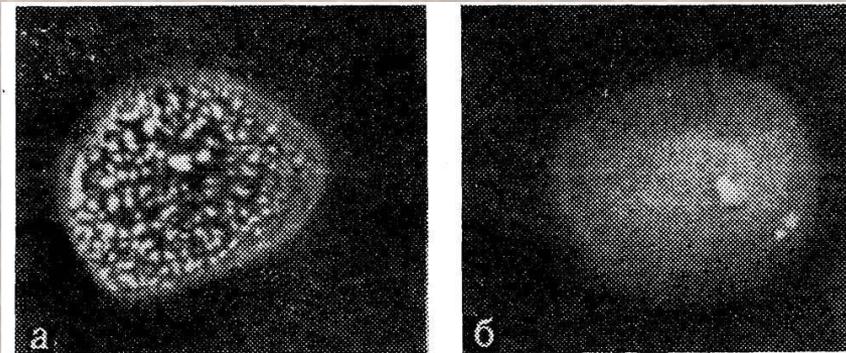


Рис. 35. Реакция агглютинации на предметном стекле.
а — агглютинация; б — отсутствие агглютинации.

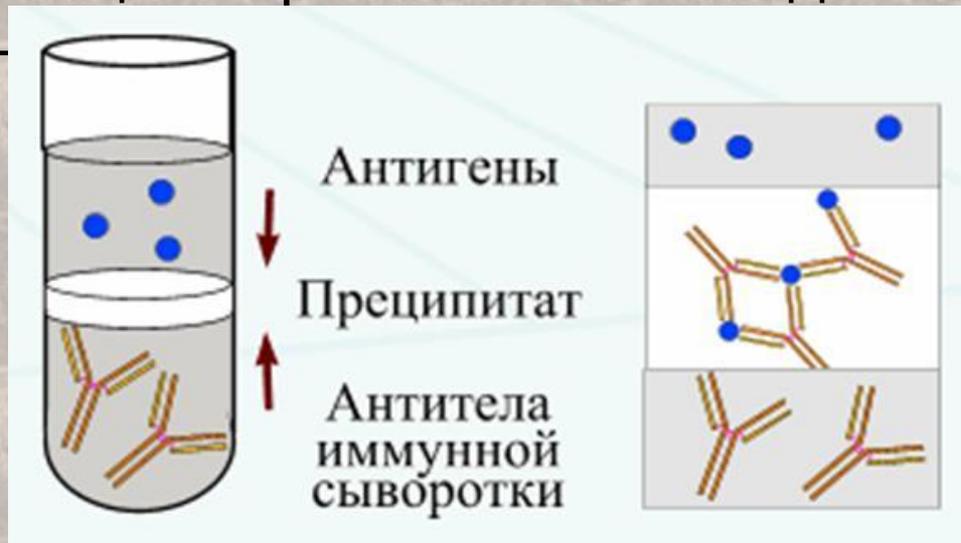
Реакция преципитации

В реакции преципитации (РП) участвует мелкодисперсный (растворимый антиген). При контакте с антителами — преципитинами образуется осадок.

Реакцию преципитации можно проводить в жидкой среде (в узких пробирках) и в геле (в чашках Петри). При постановке

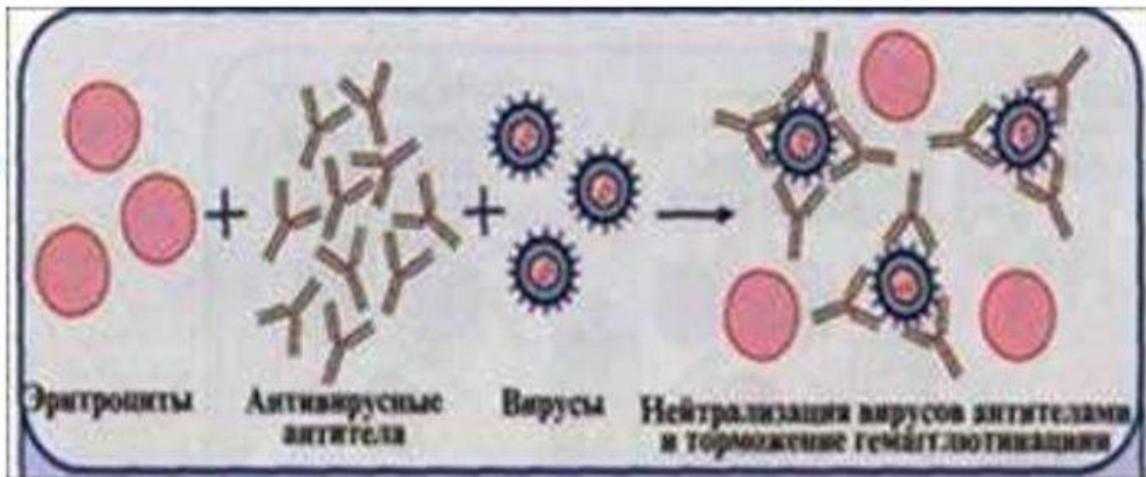
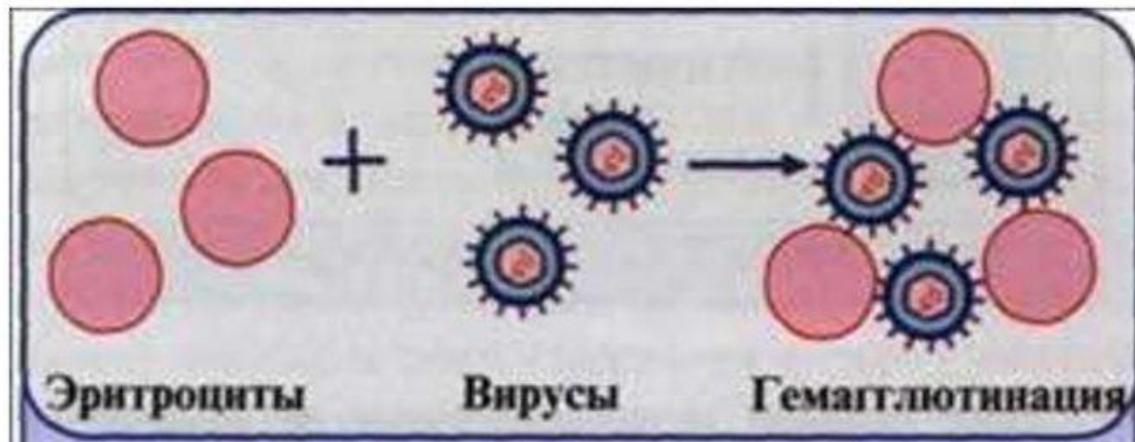
РП в узких пробирках жидкость, содержащую один из реагентов, например, прозрачный экстракт из микробных клеток (0,2 мл), наслаивают на прозрачную преципитирующую сыворотку (0,2 мл). В положительных случаях на границе соприкосновения жидкостей через 1—5

мин



о.

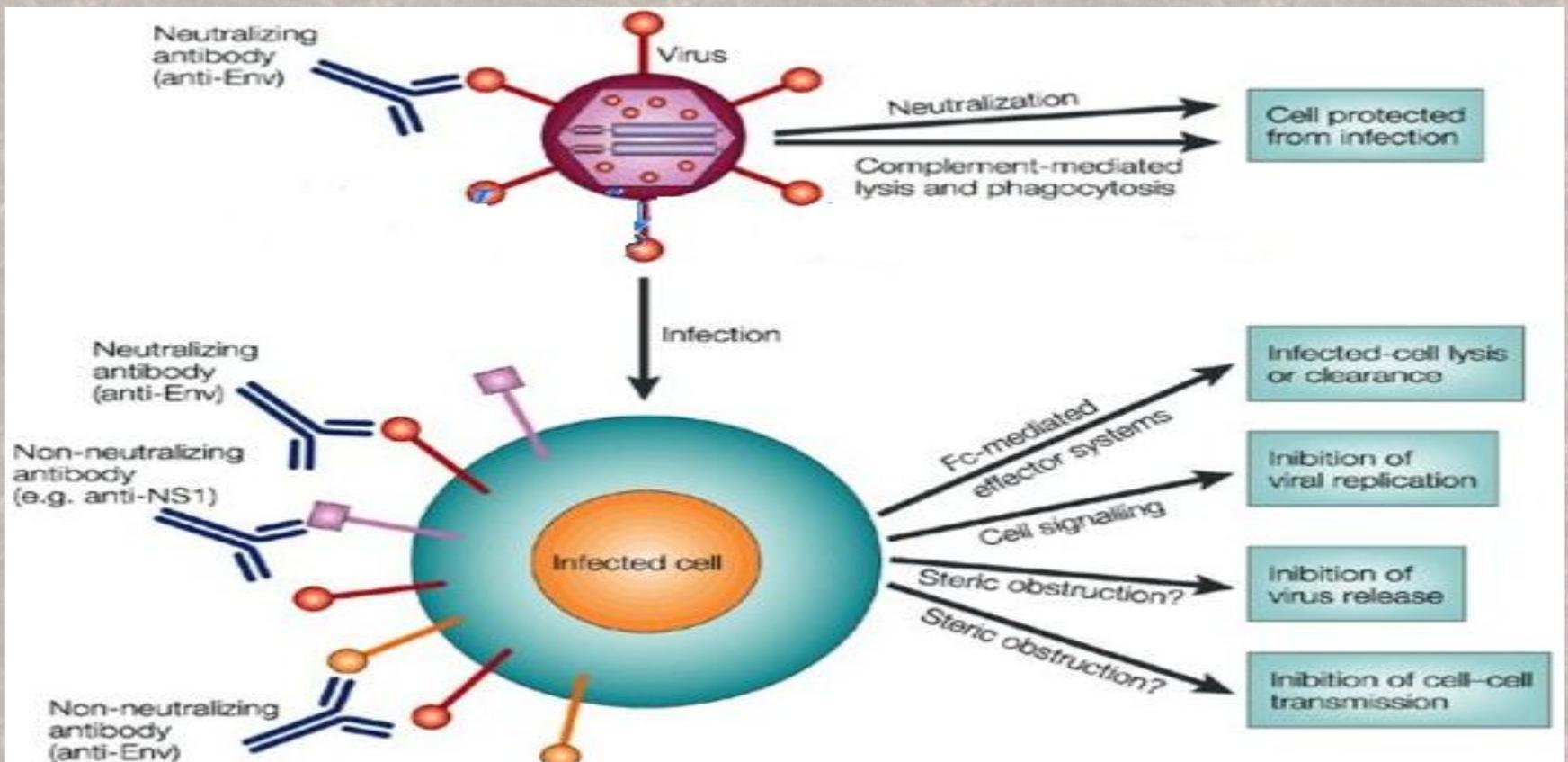
Реакция торможения гемагглютинации (РТГА).



*экспресс методы
исследования*

направлено на выявление
возбудителя инфекционного
заболевания
в исследуемом материале
на основе:

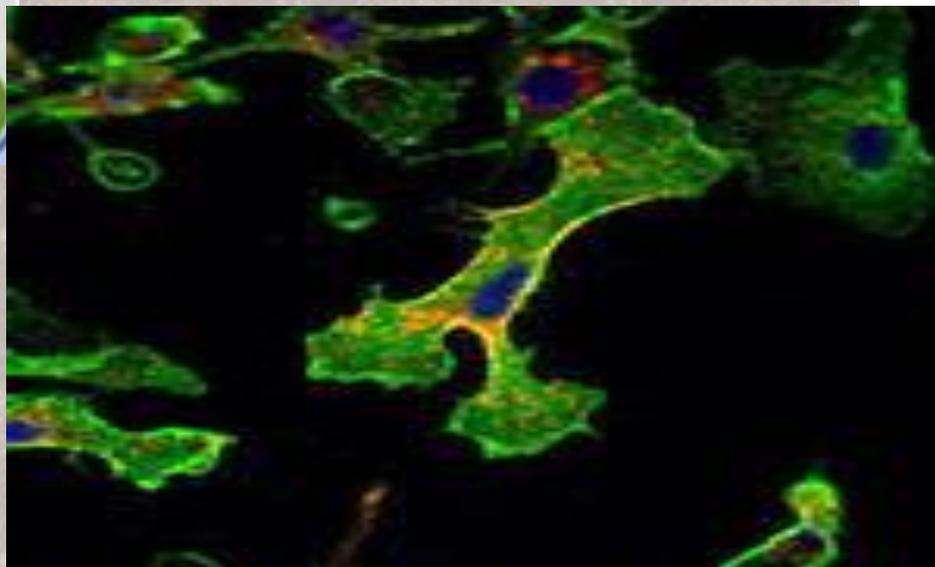
антисгенных свойств



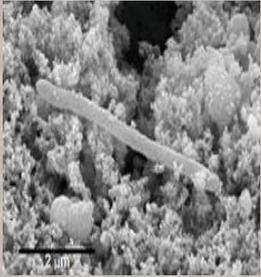
сероидентификация



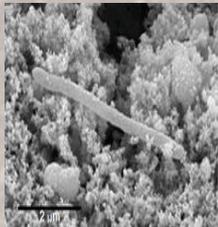
РИФ



МЕТОД ИММОБИЛИЗАЦИИ



мазок висячая
капля
движение

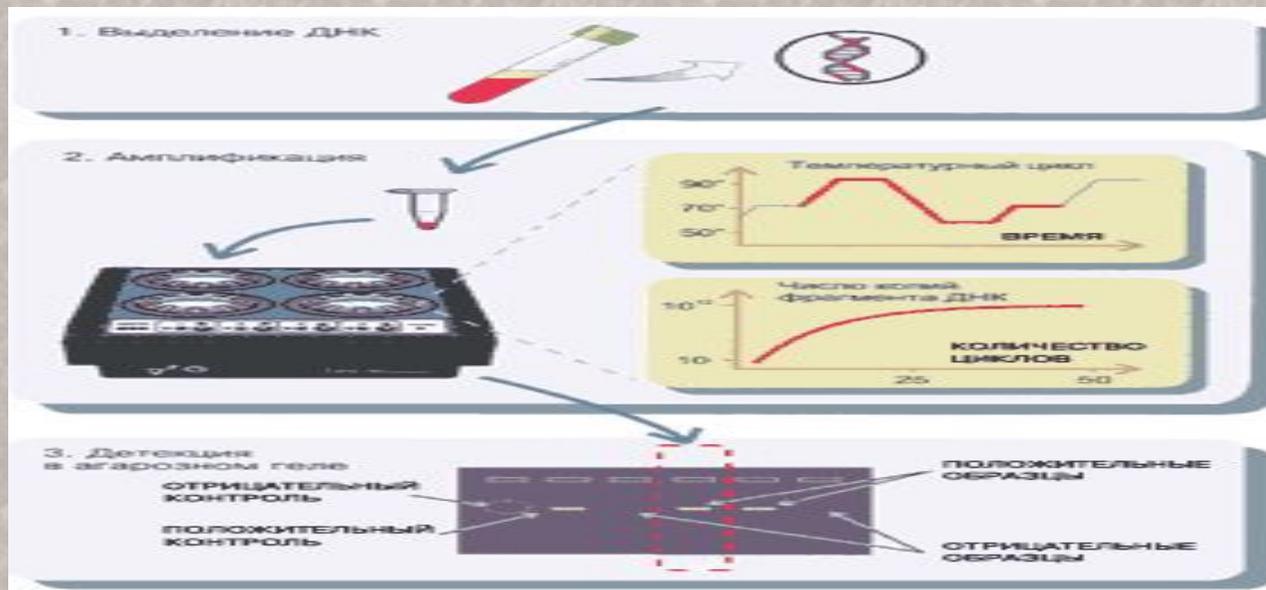


+ диагностическ
ая сыворотка

мазок висячая
капля
иммобилизаци
я движения



молекулярно-генетический метод позволяющий дифференцировать инфекционного агента в клиническом материале на основе стабильного участка нуклеиновой кислоты

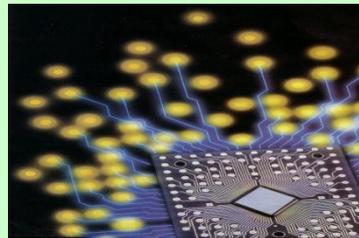


Молекулярно-генетические методы

- Полимеразная цепная реакция (PCR)
- Методика разветвленных зондов (branched DNA)
- Транскрипционно-опосредованная амплификация
- Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA)
- Амплификация с вытеснением цепи (SDA)
- Гибридный захват (HC)
- Лигазная цепная реакция (LCR)

Другие...

QV репликаза, Биочипы



В ОСНОВЕ

молекулярно-генетических

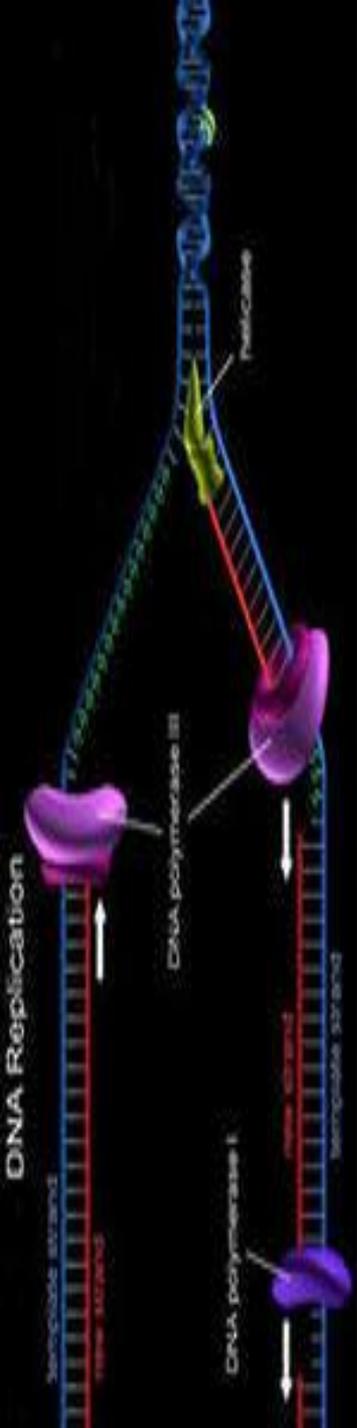
методов исследования ЛЕЖИТ

уникальное свойство НК -
способность К

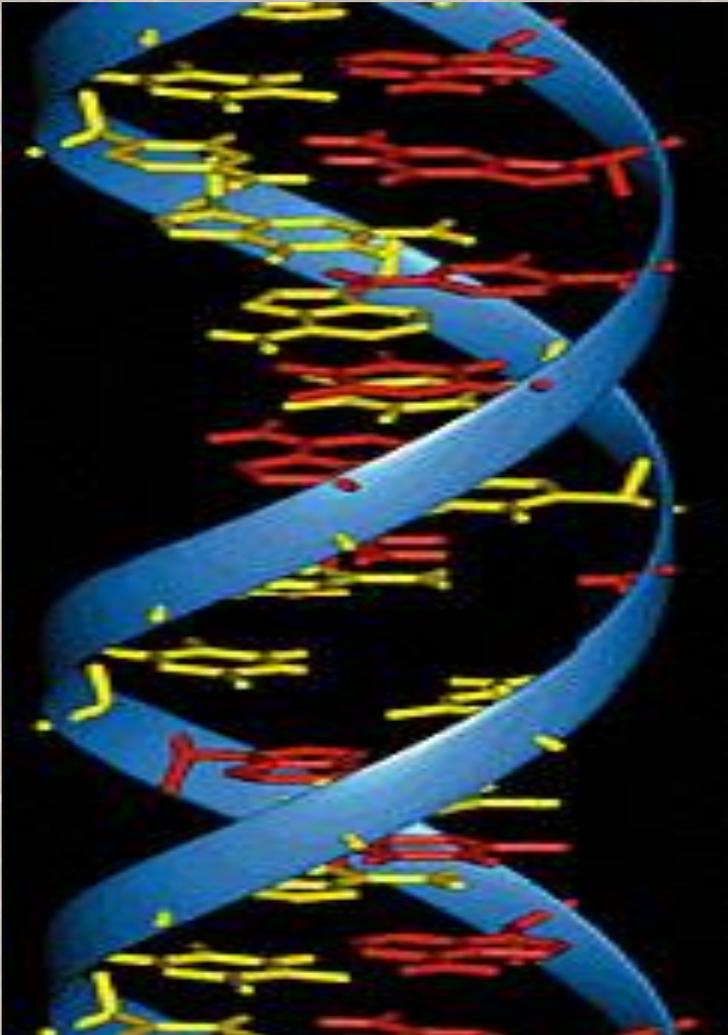
саморепродукции,

комплементарному

достраиванию матрицы



ДНК – универсальный носитель генетической информации и наследственных признаков у всех существующих на Земле организмов.



- 95% генетической информации содержится в ядре клетки, в виде хромосом (комплекса ДНК и белков)
- У человека ядерная ДНК находится в виде 46 хромосом (23 пары), из которых 22 соматические и две половые X и Y.
- 5% генетической информации содержится в органеллах цитоплазмы – митохондриях.
- Исключение - вирусы, которые могут нести как РНК, так и ДНК

в начале 1970-х годов

норвежский учёный

Хьелль Клеппе

из лаборатории нобелевского лауреата

Хара Гобинды Хораны

предложил

способ амплификации ДНК

с помощью пары коротких одноцепочечных
молекул ДНК — синтетических праймеров



Хара Гобинды Хораны

практического применения

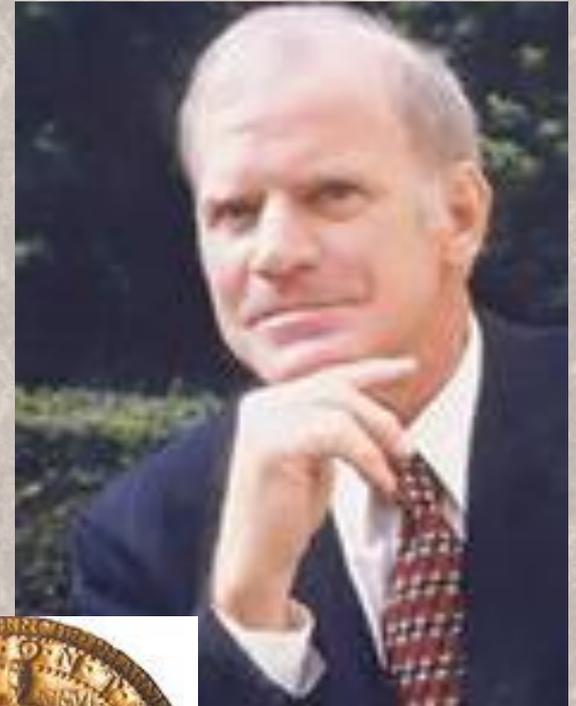
в то время эта идея не нашла

полимеразная цепная
реакция (ПЦР) была
изобретена
в **1983** году
американским
биохимиком
Кэри Муллисом



его целью было создание метода, который бы позволил амплифицировать ДНК в ходе многократных последовательных удвоений исходной молекулы ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы

первая публикация
по методу ПЦР появилась в
ноябре **1985** года в журнале
Science



**спустя 8 лет после этого
за изобретение метода ПЦР
К. Муллис получил Нобелевскую**

ПЦР-диагностика включает:

I. пробоподготовку

• забор исследуемого материала и его транспортировку в лабораторию



I. пробоподготовку

- **экстракция ДНК (РНК) из исследуемого образца**



**экстракция (извлечения) ДНК
из биопрепаратов
и удаление или нейтрализация
посторонних примесей для
получения ДНК с чистотой,
пригодной для постановки
реакции амплификации**

II. АМПЛИФИКАЦИЮ специфических фрагментов ДНК



амплификатор Corbett

амплификация - лат. **amplificatio** -
увеличение, распространение

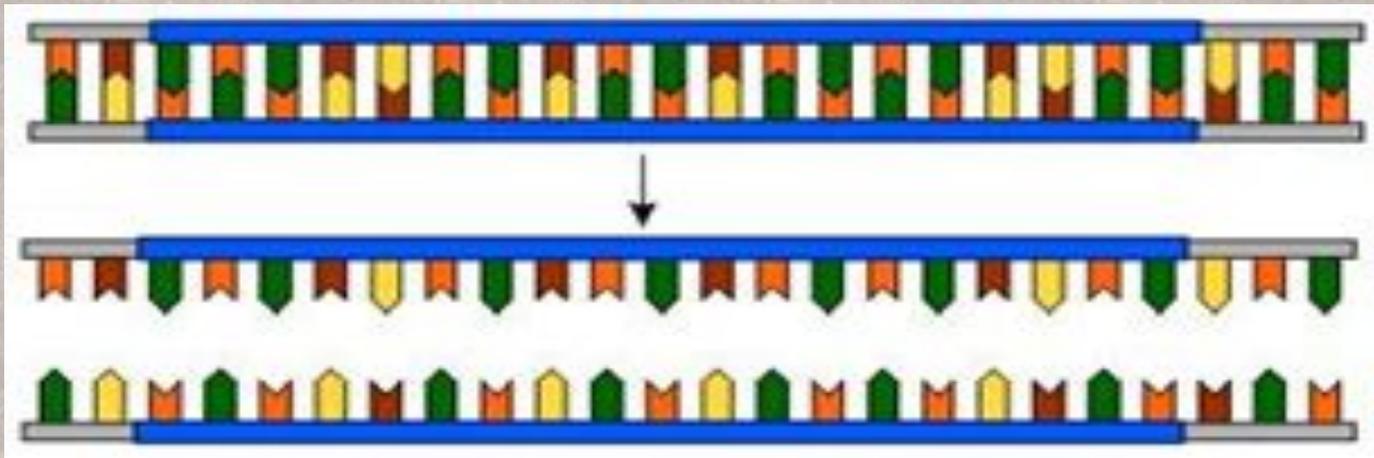
АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК- это процесс, увеличивающий число копий какого-либо гена или последовательности ДНК в исследуемом материале (выше обычного уровня)
in vitro

II. АМПЛИФИКАЦИЮ специфических фрагментов ДНК

ПРОЦЕСС АМПЛИФИКАЦИИ

включает:

а) денатурацию - **исходная смесь
нагревается до 94°C,
что обеспечивает расхождение нити
ДНК**



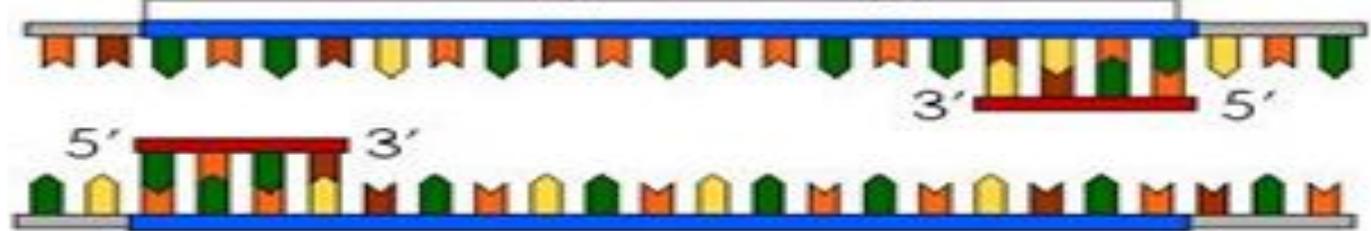
в) отжиг – этап при котором температура исходной реакционной смеси снижается до 52 – 60°C и происходит комплементарное связывание

примеров с нитями матричной ДНК

праймеры – это искусственно синтезированные короткие однонитевые ДНК (20 – 30 нуклеотидов), выполняющие функцию «затравок» при ферментативном синтезе ДНК

расстояние между праймерами определяет длину синтезируемых фрагментов ДНК

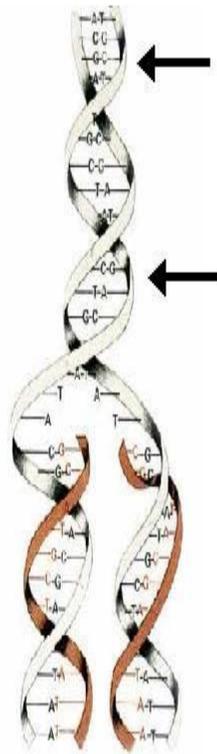
Искомый фрагмент ДНК



при ПЦР используют 2 праймера, которые комплементарны

3'-концевым последовательностям амплифицируемого

Диаметр двойной спирали ДНК
20 ангстрем



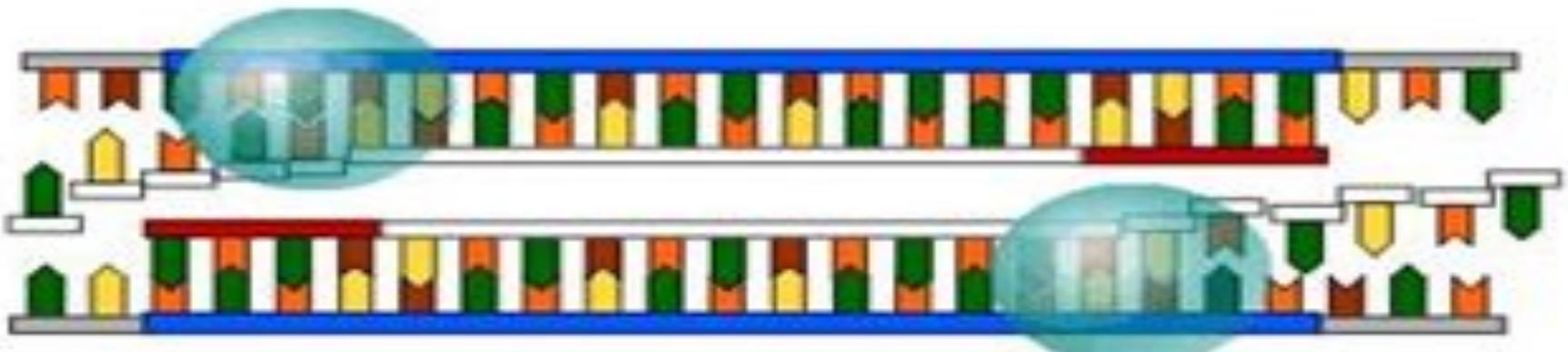
Шаг спирали - 34
ангстрема на полный
виток - 10 пар
оснований

с) синтез новой цепи ДНК - полимеризация

это процесс в ходе которой
Тaq-полимераза катализирует удлинение праймеров (с 3'-конца), что обеспечивает синтез новых цепей ДНК

Тaq-полимераза должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов

Тaq-полимераза - термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая реакцию полимеризации ДНК

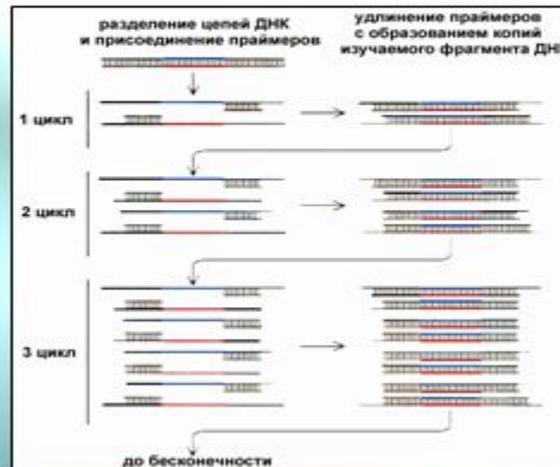


температура реакционной смеси для проявления оптимальной активности **Тaq-полимеразы** соответствует **72°C**

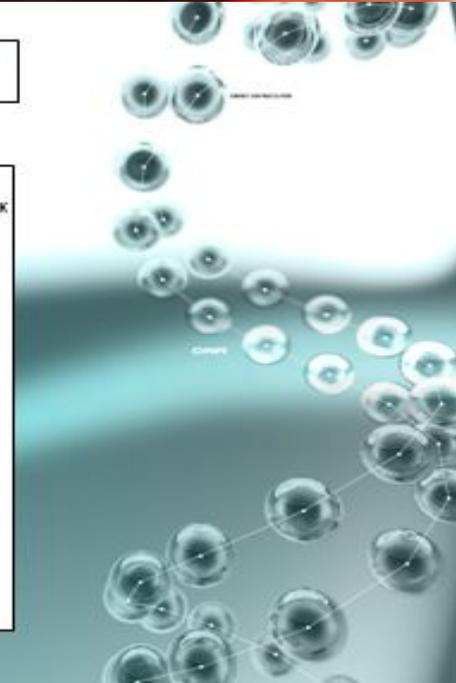
процесс амплификации многократно повторяется в приборе – амплификаторе (термоциклере), что позволяет получить огромное количество копий нужного фрагмента ДНК



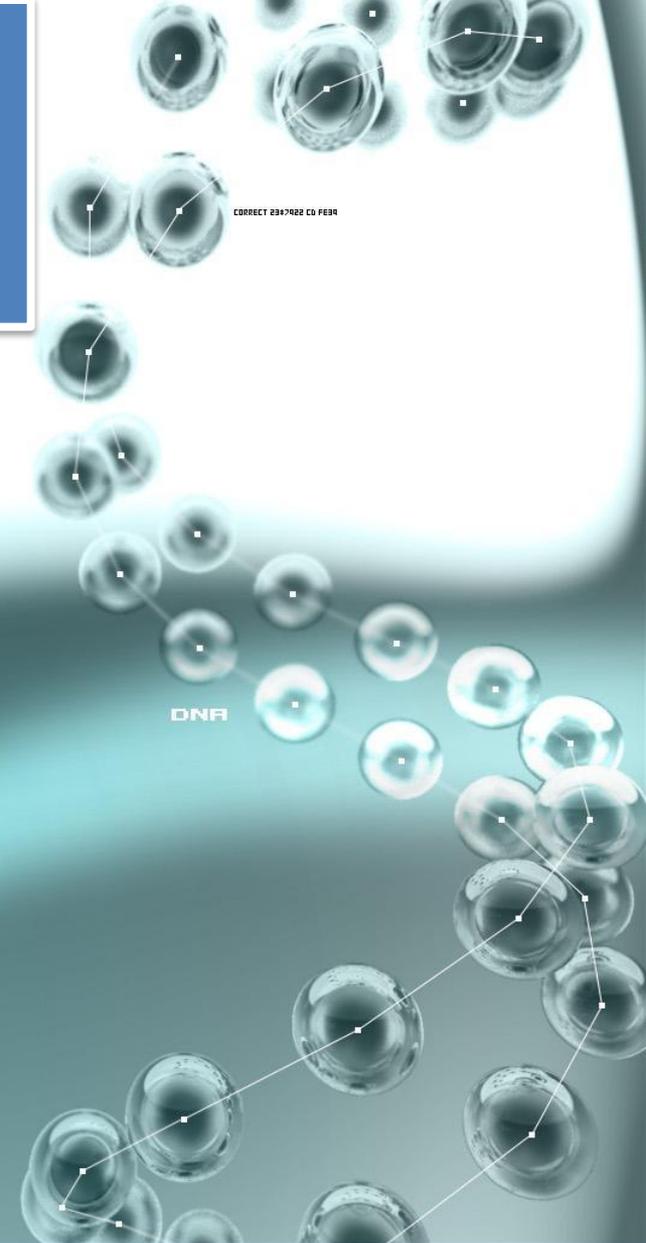
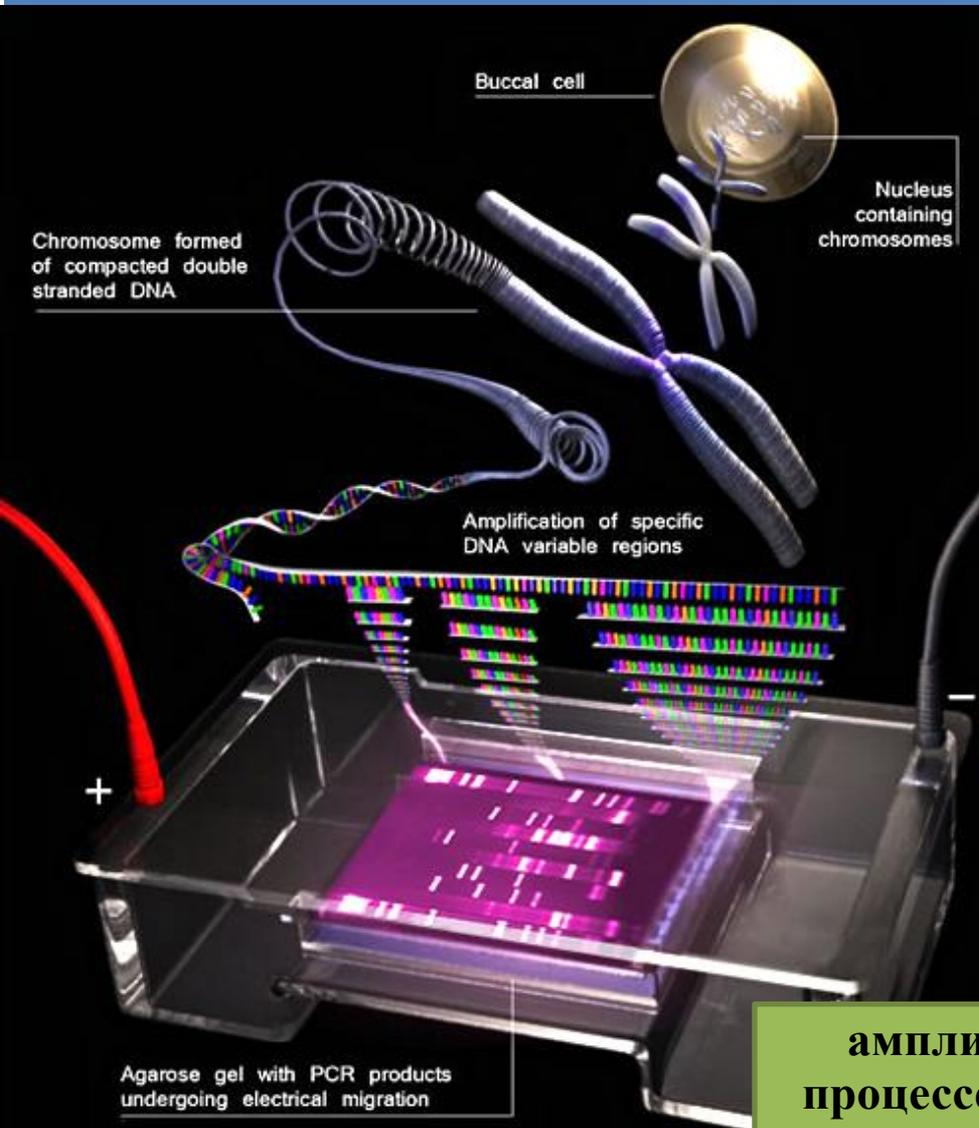
Общая схема амплификации изучаемого фрагмента ДНК



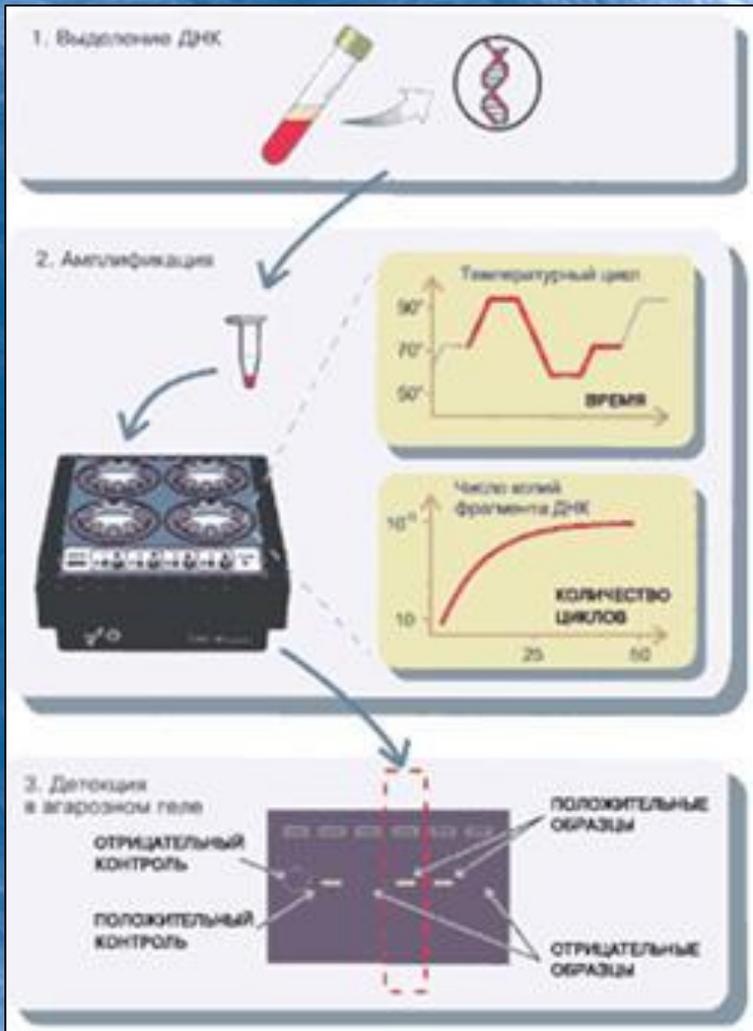
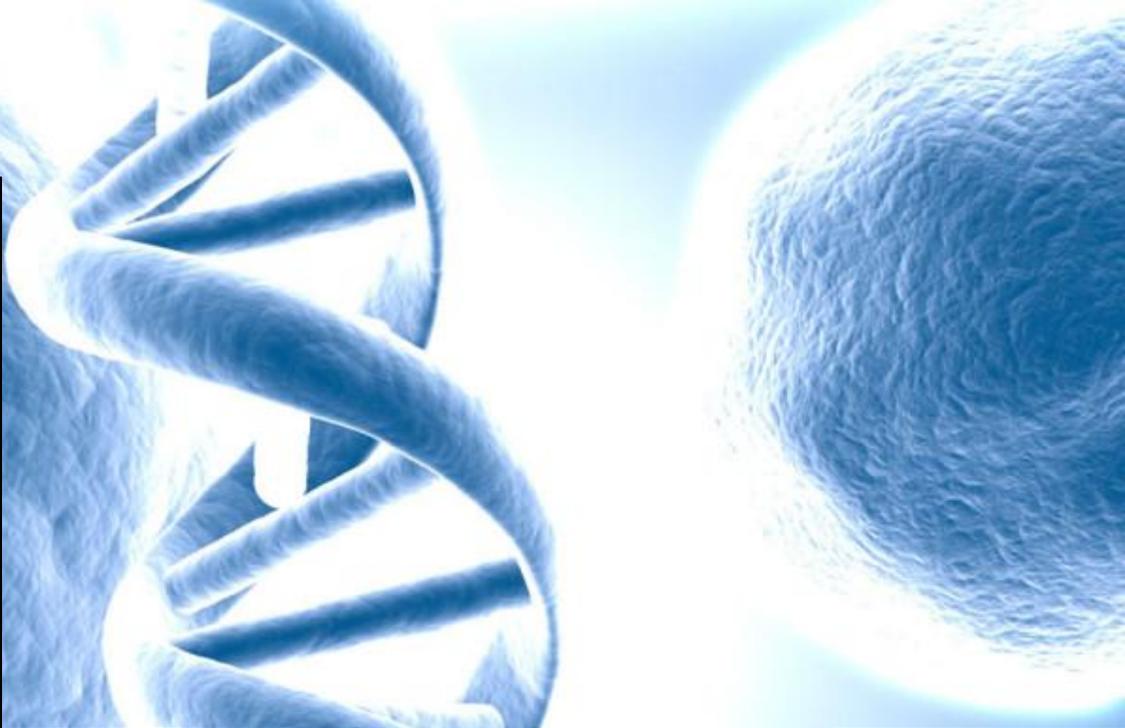
анализируемый участок ДНК амплифицируется более чем в миллион раз в результате проведения



III. детекция продуктов амплификации



амплифицированный фрагмент выявляют в процессе электрофореза в **1,6 %** агарозном геле



Phase Ring Position
Focus
Voltage 6V
Illumination
Phase Telescope
 Out
 In
Reset
Objective: 4x 10x 20x 40x
Choose A Sample
Neuroblastoma

достоинства метода ПЦР:

- среди методов диагностики инфекционных возбудителей ПЦР обладает наиболее высокими показателями чувствительности и специфичности (для Ампли-Сенс ПЦР-систем – **1000** микроор-мов/1 мл)**
- возможность использования разнообразного клинического материала**
 - возможность одновременного выявления нескольких микроорганизмов в одной биологической пробе, в отличие от бактериологических методов, где для разных возбудителей используются разные способы культивирования;**

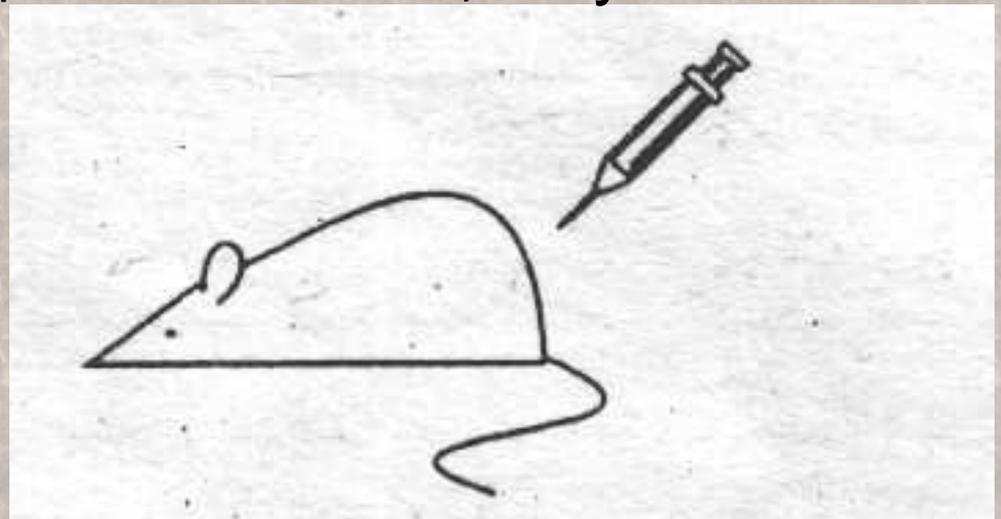
- **повышенная стабильность при транспортировке, т.к. нет необходимости сохранять возбудителя в живом виде**
- **скорость проведения анализа (иногда < 24 ч.)**
- **точное определение этиологии инфекции**
- **определение количества возбудителя, это особенно актуально для факультативных патогенов, которые вызывают патологию только при определенных условиях**
- **проведение контроля за течением инфекционного процесса**

• метод ПЦР, как и любой другой тест молекулярной диагностики, во многом зависит от правильности забора и транспортировки исследуемого материала

Сфера применения ПЦР

- Диагностика большого спектра **частной патологии**. Наиболее часто используется в практике для диагностики вирусного гепатита, герпетической, хламидиозной и микоплазменной инфекции, туберкулеза, сальмонеллеза, сифилиса, цитомегаловируса, ВИЧ.
- Метод широко применяется в диагностике онкологических заболеваний: высокая чувствительность метода позволяет определять аномальную ДНК в ничтожно малых количествах (10^{-15} - 10^{-18} степени), что означает выявление неопластических клеток на **доклинической** стадии опухолевого процесса.
- ПЦР применяется для пренатальной диагностики многих моногенных наследственных заболеваний
- В судебно-медицинской практике метод ПЦР используется для определения отцовства, идентификации личности неопознанных трупов, доказательства причастности какого либо лица к совершению преступления
- Очень перспективным направлением является использование ПЦР для определения патогенов в пищевых продуктах и абиотических средах (предметы обихода, жилище, одежда и т.п.). Метод используется в биотехнологии для определения трансгенных организмов.
- Современная трансплантационная хирургия невозможна без использования метода ПЦР, который гарантированно показывает степень тождественности гомотрансплантатов.

- **Биологический метод** (экспериментальный или биопроба) - заражение исследуемым материалом чувствительных лабораторных животных или других биологических объектов (куриные эмбрионы, культуры клеток). Его используют для выделения чистой культуры возбудителя, определения типа токсина, активности антимикробных химиотерапевтических препаратов и т.д.
- **Ограничение** - к большинству возбудителей антропонозных инфекций человека лабораторные животные невосприимчивы
- Биологический метод неэкономичен, негуманен



Ни один из современных методов не обеспечивает 100 % выявления возбудителя инфекции

Целесообразным является :

- ✓ **использование не менее 2-х методов диагностики;**
- ✓ **нередко требуется проведение повторных исследований**



***Задача врача* заключается в
правильном
выборе метода исследования и
грамотной оценке его результатов !!!!**