



**Тема: Введение в дисциплину
«Клиническая лабораторная
микробиология». Современные
методы клинических
микробиологических лабораторий.
к.б.н.Шевченко Н.И.**

Вопросы, разбираемые на лекции.

- 1. Предмет и задачи клинической микробиологии. Размещение, оборудование, безопасность работы бактериологической лаборатории в клинике.
- 2. Методы микробиологической диагностики клинического материала. Иммунологические и молекулярно-генетические методы в клинической микробиологии.

Клиническая микробиология

- **наука, изучающая взаимоотношения, складывающиеся между макро- и микроорганизмами в норме, при патологии в динамике патологического процесса с учетом проводимой терапии до констатации клиницистом состояния клинического или полного выздоровления.**

Задачи клинической микробиологии в неинфекционном стационаре

- - проводит микробиологические исследования в клинике, направленные на изучение этиологии инфекционных процессов

Задачи клинической микробиологии в неинфекционном стационаре

- - оценивает эпидемическую ситуацию в стационаре на основании бактериологических исследований материалов, полученных от больных и характера микрофлоры, выделенной из госпитальной среды

Задачи клинической микробиологии в неинфекционном стационаре

- - осуществляет рекомендации по рациональной антибиотикотерапии больных на основании изучения чувствительности возбудителей к антибиотикам

Задачи клинической микробиологии в неинфекционном стационаре

- - разрабатывает стратегию и тактику применения химиотерапевтических препаратов в условиях стационара

- *Клиническим микробиологам следует постоянно помнить, что материал и задачи исследования, проводимые в профильных лабораториях, существенным образом отличаются от таковых в системе санитарно - эпидемиологической службы.*

**Для решения данных задач
врач лабораторной
диагностики должен
располагать :**

- **необходимой информацией о
составе и свойствах представителей
нормальной микрофлоры,
характерной для различных
биотопов тела человека**

Для решения данных задач врач лабораторной диагностики должен располагать :

- необходимой информацией о возбудителях инфекций различных систем организма. В рамках клинической микробиологии наряду с условно патогенными микроорганизмами, вызывающими оппортунистические инфекции, рассматривают патогенные микроорганизмы и вызываемые ими инфекции.

Нормальная микрофлора

- *организм человека и населяющие его микроорганизмы – это единая экосистема. Организм человека заселяют (колонизируют) примерно 500 видов м/о в виде сообществ – микробиоценоз.*

Нормальная микрофлора

- Соотношение разнообразных популяций микробов отдельных органов и систем, поддерживающее биохимическое, метаболическое и иммунологическое равновесие, необходимое для сохранения здоровья человека.

Нормальная микрофлора

- Они находятся в состоянии равновесия (эубиоза) друг с другом и организмом человека. Большинство этих м/о являются комменсалами, не причиняющими вреда человеку.

Нормальная микрофлора

- В норме многие ткани и органы здорового человека свободны от микроорганизмов, т. е. являются *стерильными. К ним относятся:*
 - • внутренние органы,
 - • головной и спинной мозг,
 - • альвеолы легких,
 - • внутреннее и среднее ухо,
 - • кровь, лимфа, спинномозговая жидкость,
 - • матка, почки, мочеточники и моча в мочевом пузыре.
- Это обеспечивается наличием неспецифических клеточных и гуморальных факторов иммунитета, препятствующих проникновению микробов в эти ткани и органы

Нормальная микрофлора

- На всех открытых поверхностях и во всех открытых полостях формируется достаточно стойкая микрофлора, специфичная для данного органа, биотопа или его участка – *эпитопа*.
Наиболее богаты микроорганизмами:
 - • ротовая полость,
 - • толстый кишечник,
 - • верхние отделы дыхательной системы,
 - • наружные отделы мочеполовой системы и кожа, особенно ее волосистая часть.

Нормальная микрофлора

- *Микроорганизмы, составляющие нормальную микрофлору, образуют четкую морфологическую структуру – биопленку, толщина которой колеблется от 0,1 до 0,5 мм. Биопленка представляет собой полисахаридный каркас, состоящий из микробных полисахаридов и муцина, который продуцируют клетки макроорганизма.*

Нормальная микрофлора

- В этом каркасе *иммобилизованы микроколонии* бактерий – представителей нормальной микрофлоры, которые могут располагаться в несколько слоев. В состав нормальной микрофлоры входят как анаэробные, так и аэробные бактерии, соотношение которых в большинстве биоценозов составляет 10:1—100:1.

Нормальная микрофлора

- *Заселение* бактериями различных областей тела начинается в момент рождения человека и продолжается на протяжении всей его жизни. Формирование качественного и количественного состава нормальной микрофлоры *регулируется сложными антагонистическими и синергическими* отношениями между отдельными ее представителями в составе биоценозов.

Нормальная микрофлора

- *В микробиоценозе различают:*
- *постоянно встречающиеся виды – характерные (индигенная, автохтонная флора)*
- *добавочные и случайные – транзиторные (аллохтонная флора). Эти м/о не способны к длительному существованию в организме.*

Нормальная микрофлора

- Постоянная микрофлора :
- - облигатная (бифидобактерии, лактобактерии, пептострептококки, кишечные палочки и др.) является основой микробиоценоза
- - факультативная (стафилококки, стрептококки, клебсиеллы, клостридии, некоторые грибы и др.)

Нормальная микрофлора

- Состав транзиторной микрофлоры *МОЖЕТ МЕНЯТЬСЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ:*
 - • возраста,
 - • условий внешней среды,
 - • условий труда, рациона питания,
 - • перенесенных заболеваний,
 - • травм и стрессовых ситуаций.

Нормальная микрофлора

- Количество характерных видов относительно невелико, но численно они всегда представлены наиболее обильно. Видовой состав транзиторных микроорганизмов разнообразен, но они немногочисленны .

Нормальная микрофлора

- Количество микроорганизмов в организме взрослого человека 10^{14} особей, преобладают анаэробы. Количество бактерий, населяющих покровные ткани (кожу, слизистые оболочки), во много раз превосходит число собственных клеток хозяина. Количественные колебания бактерий в биоценозе могут достигать для некоторых бактерий нескольких порядков и, тем не менее, укладываются в принятые нормативы.

Функции нормальной микрофлоры

- - является одним из факторов неспецифической резистентности организма. Она обладает антагонистическими свойствами против патогенной и гнилостной м/флоры(продуцируют молочную, уксусную к-ты, антибиотики, бактериоцины)

Функции нормальной микрофлоры

- - участвует в водно-солевом обмене, регуляции газового состава кишечника, обмене белков, углеводов, жирных кислот, холестерина, нуклеиновых кислот, в продукции биологически активных соединений :антибиотиков, витаминов (К, группы В и др.), ТОКСИНОВ и др.

Функции нормальной микрофлоры

- - участвует в переваривании и детоксикации экзогенных субстратов и метаболитов, что сравнимо с функцией печени

Функции нормальной микрофлоры

- - участвует в рециркуляции стероидных гормонов и желчных солей в результате экскреции метаболитов из печени в кишечник и последующего возврата в нее

Функции нормальной микрофлоры

- - выполняет морфокинетическую роль в развитии различных органов и систем организма, участвует в физиологическом воспалении слизистой оболочки и смене эпителия

Функции нормальной микрофлоры

- - выполняет антимутагенную функцию, разрушая канцерогенные вещества в кишечнике. Но некоторые м/о могут продуцировать сильные мутагены. Ферменты бактерий кишечника преобразуют искусственный подсластитель цикломат в активный канцероген (циклогексамин) для мочевого пузыря.

Функции нормальной микрофлоры

- -экзополисахариды (гликокаликс) м/о, входящие в состав биопленки, защищают микробные клетки от разнообразных физико-химических воздействий

Функции нормальной микрофлоры

- - м/флора кишечника оказывает влияние на формирование и поддержание иммунитета. В кишечнике находится 1,5 кг м/о, антигены которых стимулируют иммунную систему.

Функции нормальной микрофлоры

- Естественным неспецифическим стимулятором иммуногенеза является мурамилпептид, образующийся из пептидогликана бактерий под влиянием лизоцима и др.литических ферментов кишечника.

Функции нормальной микрофлоры

- В результате происходит обильное насыщение кишечной ткани лимфоцитами и макрофагами, т.е. в норме кишка находится как бы в состоянии хронического воспаления.

Функции нормальной микрофлоры

- - участвует в колонизационной резистентности. Колонизационная резистентность – совокупность защитных факторов организма и конкурентных, антагонистических и других свойств нормальной микрофлоры (в основном, анаэробов) кишечника, придающих стабильность м/флоре и предотвращающих колонизацию слизистых оболочек посторонними м/о.

Функции нормальной микрофлоры

- При снижении колонизационной резистентности увеличивается количество и спектр аэробных условно патогенных микробов. Их транслокация через слизистые оболочки может привести к развитию эндогенного гнойно-воспалительного процесса.

Функции нормальной микрофлоры

- - представители нормальной микрофлоры при снижении сопротивляемости организма вызывают гнойно-воспалительные процессы.

Функции нормальной микрофлоры

- - в результате действия микробных декарбоксилаз и ЛПС высвобождается дополнительное количество гистамина, что может вызывать аллергические состояния.

Функции нормальной микрофлоры

- - является хранилищем и источником хромосомных и плазмидных генов , в частности генов лекарственной устойчивости к антибиотикам

Функции нормальной микрофлоры

- - отдельных представителей нормальной микрофлоры используют в качестве санитарно-показательных м/о, свидетельствующих о загрязнении окружающей среды (воды, воздуха и т.д.) выделениями человека и , следовательно, об их эпидемиологической опасности.

Микробиологические методы исследования

- прямого обнаружения возбудителя в организме больного
- — бактериоскопическое и бактериологическое исследования
- - методы косвенного доказательства наличия возбудителя в организме больного — серологические исследования, направленные на обнаружение специфических антигенов в инфицированном материале или антител в сыворотке крови и различных секретах организма больного.

Микробиологические методы исследования

- Бактериоскопический (микроскопия препаратов) разрешающая способность метода 10^4 - 10^5 КОЕ/мл):
 - световая;
 - в темном поле;
 - фазово-контрастная;
 - люминесцентная.

Микробиологические методы исследования

- Культуральный (разрешающая способность метода 10^3 КОЕ/мл);
- Иммунологический;
- Молекулярно-генетический.

Бактериоскопический метод

- Достоинства:
 - 📌 быстро,
 - 📌 дешево,
 - 📌 оценка качественного и количественного состава микрофлоры,
 - 📌 оценка тинкториальных свойств микроорганизмов,
- Недостатки:
 - 📌 невозможность идентификации микроорганизмов,
 - 📌 не позволяет определять лекарственную чувствительность,
 - 📌 не все микроорганизмы поддаются окрашиванию.

Культуральный метод

- Достоинства:
 - 📌 получение чистой культуры м/о,
 - 📌 идентификация выделенных штаммов,
 - 📌 определение лекарственной чувствительности.
- Недостатки:
 - долго,
 - дорого,
 - не все м/о поддаются культивированию *in vitro*.

Иммунологический (иммунобиологический) метод

Серологические реакции (in vitro)		Кожно-аллергические пробы:		Методы оценки иммунного статуса
Выявление антигенов микроорганизмов:		Выявление антител в сыворотке больного (серодиагностика)	выявление специфической гиперчувствительности (аллергии)	
в пат. м-ле (экспресс-диагностика)	в чистой культуре (серол. идентификация)			

Иммунологические методы

- Иммунологические методы используют, как для выявления титра антител в сыворотке крови (серодиагностика), так и для обнаружения антигенов в биологических жидкостях.
- Общие закономерности иммунологических методов (ИМ):
- исследование производится *in vitro*;
- проявляются при иммунологическом соответствии (гомологичности) антигена и антитела;
- протекают в 2 фазы (невидимая и видимая).
- Для количественной характеристики иммунологических методов исследования используют такие понятия, как чувствительность и специфичность.
- В идеале чувствительность и специфичность иммунологических методов приближается к 100%.

Оценка методов

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{число _ положительных _ реакций _ у _ истинных _ больных}}{\text{число _ обследованных _ больных _ с _ подтвержденным _ диагнозом}} \times 100\%;$$

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{число _ отрицательных _ реакций _ в _ контрольной _ группе}}{\text{число _ обследованных _ в _ контрольной _ группе}} \times 100\%.$$

Иммунологические исследования

- Обнаружение в сыворотке крови больного антител к возбудителю инфекции или соответствующего антигена позволяет установить причину заболевания.

Реакция агглютинации

- Реакции агглютинации — это простые реакции склеивания корпускулярных антигенов с помощью антител.
- Различают:
- — *прямые реакции агглютинации*, которые используют для выявления антител в сыворотке крови больного. Добавление взвеси убитых микробов к сыворотке больного вызывает образование хлопьевидного осадка (положительная реакция склеивания микробов антителами).

Реакция агглютинации

- — *реакция пассивной, или непрямой гемагглютинации* основана на использовании эритроцитов с адсорбированными на их поверхности антигенами, взаимодействие которых с соответствующими антителами сыворотки крови больных приводит к образованию фестончатого осадка.

Реакция агглютинации

- — *реакция торможения гемагглютинации* основана на способности антител иммунной сыворотки нейтрализовать вирусы, которые в результате теряют свойство склеивать эритроциты. Используется для диагностики вирусных болезней;
- — *реакция коагглютинации* — разновидность реакции агглютинации, в которой антигены возбудителя определяют с помощью стафилококков, предварительно обработанных иммунной диагностической сывороткой.

Реакция латекс-агглютинации (РЛА)

- Носители антигенов или антител - частицы полистирольного латекса, которые служат носителями антигена и при образовании иммунных агрегатов играют роль "мостиков" между молекулами антител. Латексные частицы являются как бы искусственными эритроцитами, но более устойчивы к внешним воздействиям.

Реакции преципитации

- Реакции преципитации — реакции, в которых происходит осаждение комплекса антиген-антитело. Антиген в данном случае должен быть растворимым. Осадок комплекса антиген-антитело называется преципитатом. Реакцию ставят путем наслоения раствора антигена на иммунную сыворотку. При оптимальном соотношении антиген-антитело на границе этих растворов образуется непрозрачное кольцо преципитата.

Реакции преципитации

- Диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации антигена. Наибольшее распространение получила реакция преципитации в полужидком геле агара (двойная иммуно-иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез и др.).

Реакция нейтрализации

- Реакция нейтрализации основана на способности антител иммунной сыворотки нейтрализовать повреждающее действие микроорганизмов или их токсинов на чувствительные клетки или ткани. При отсутствии повреждающего эффекта смеси антител и микробов или их токсинов на культуру клеток говорят о специфичности взаимодействия комплекса антиген-антитело

Реакции с участием комплемента

- Реакции с участием комплемента основаны на активации комплемента в результате присоединения его к комплексу антиген-антитело. Если комплекс антиген-антитело не образуется, то комплемент присоединяется к комплексу эритроцит-антиэритроцитарное антитело, вызывая тем самым гемолиз (разрушение) эритроцитов (реакция радиального гемолиза).

Реакция с использованием меченых антител или антигенов

- Реакция основана на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками, мечеными флюорохромами, способны светиться в ультрафиолетовых лучах люминисцентного микроскопа (реакция иммунофлюоресценции).

Реакция с использованием меченых антител или антигенов

- **В иммуноферментном анализе** вместо флюорохромов иммунную сыворотку можно метить ферментом (пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой). Реакцию оценивают по окрашиванию раствора в желто-коричневый (пероксидаза) или желто-зеленый (фосфотаза) цвет.

Реакция с использованием меченых антител или антигенов

- Используют также ферменты, разлагающие не только хромогенный, но и люмогенный субстрат. В этом случае при положительной реакции появляется свечение. Подобно иммунофлюоресценции иммуноферментный метод применяют для обнаружения антигенов в клетках или титрования антител.

Радиоиммунологический метод

- количественное определение антител или антигенов, меченых радионуклидами, с применением аналогичных антигенов или антител.
- Методы применяют для выявления антигенов микробов, определения гормонов, ферментов, лекарственных веществ и иммуноглобулинов. Самый чувствительный, позволяющий обнаружить малое содержание антигенов (0,5 нг/мл), — радиоиммунный метод, однако он требует специального оборудования.

Иммуноблоттинг

- применяют для выявления антител к отдельным антигенам или «узнавания» антигенов по известным сывороткам. Метод состоит из 3 этапов:
- - разделения биологических макромолекул (например, вируса) на отдельные белки с помощью электрофореза в полиакриламидном геле
- - переноса разделенных белков из геля на твердую подложку (блот) путем наложения пластины полиакриламидного геля на активированную бумагу или нитроцеллюлозу (электроблоттинг)

Иммуноблоттинг

- -выявления на подложке искомым белков с помощью прямой или непрямой иммуноферментной реакции. Как диагностический метод иммуноблоттинг используют при ВИЧ-инфекции. Диагностическую ценность имеет обнаружение антител к одному из белков внешней оболочки вируса.

Иммуногистологические методы

- предназначены для определения антигенов на поверхности или внутри клетки/В этой реакции для выявления антигенов пользуются или иммунофлюоресценцией, или иммуноферментными конъюгатами с пероксидазой. Количество специфических антигенов определяют по интенсивности окрашивания. Иногда используют автоматическую регистрацию с помощью спектрофотометра.

Иммунологические методы

- Преимущества : методы экспресс-диагностики, позволяющие определить антигены возбудителей в течение нескольких минут или часов.
- Недостатки :
- - Несмотря на гибель бактерий после проводимой этиотропной терапии, антигены возбудителей могут персистировать в организме от 3 до 4 недель и выявляться данными методами

Недостатки :

- - Существует широкое антигенное родство между родами и видами внутри каждого семейства бактерий и даже среди различных семейств. Это может привести к получению ложноположительных результатов
- - Определение антигенов бактерий не позволяет установить чувствительность возбудителей к антибиотикам, что также снижает значимость этих методов.

Недостатки :

- используются для постановки ретроспективного диагноза, так как они становятся положительными к концу 1—2-й недели болезни. В дальнейшем их титр обычно нарастает, что является в диагностическом отношении очень важным показателем. Поэтому серологические реакции рекомендуется повторять с интервалом в 5—10 дней. Реакции считаются положительными в том случае, если титр их повышается при повторном исследовании в 4 раза и более.

Недостатки :

- Серологические реакции имеют лишь относительную достоверность, так как могут быть неспецифическими или положительными у лиц, перенесших соответствующую инфекцию в прошлом (анамнестическая реакция), а также у получивших профилактические прививки (прививочная реакция).

Молекулярно-генетическая диагностика

- раздел лабораторной диагностики *in vitro*, включающий методы, направленные на анализ ДНК, РНК, белков.
- Разделы молекулярной диагностики:
 - - молекулярно-генетический анализ
 - - протеомный анализ

Молекулярно-генетическая диагностика

- Возможности :
- - качественный скрининг
- - количественный анализ (вирусная нагрузка)
- - типирование
- - прогноз заболевания
- - терапевтический мониторинг

Молекулярно-генетические методы исследований

- Среди большого многообразия гибридизационных методов молекулярный анализ нуклеиновых кислот (МАНК) – синоним ПЦР наиболее широко используется в микробиологической диагностике.

Молекулярно-генетические методы исследований

- Принцип метода **полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Polymerase chain reaction (PCR))** был разработан Кэри Мюллисом (фирма "Cetus", США) в 1983г. и в настоящее время широко используется как для научных исследований, так и для диагностики в практическом здравоохранении .

Молекулярно-генетические методы исследований

- В основе метода ПЦР лежит природный процесс - комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция носит название **репликации ДНК**.
- Естественная репликация ДНК включает в себя несколько стадий:

Молекулярно-генетическая диагностика

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

Молекулярно-генетическая диагностика

- Данный процесс можно использовать для получения копий **коротких участков ДНК, специфичных для конкретных микроорганизмов**, т.е. осуществлять целенаправленный поиск таких специфических участков, что и является целью генодиагностики для выявления возбудителей инфекционных заболеваний.

Молекулярно-генетическая диагностика

- Таким образом, ПЦР представляет собой многократное увеличение числа копий (амплификация) специфического участка ДНК, катализируемое ферментом ДНК-полимеразой.

Молекулярно-генетическая диагностика

- Для проведения амплификации необходимы следующие компоненты:
- **ДНК-матрица** (ДНК или ее часть, содержащая искомый специфический фрагмент);
- **Праймеры** - синтетические олигонуклеотиды (20-30 нуклеотидных пар), комплементарные последовательностям ДНК на границах определяемого специфического фрагмента. Выбор специфического фрагмента и подбор праймеров играет важнейшую роль в специфичности проведения амплификации, что сказывается на качестве проведения анализа.

Молекулярно-генетическая диагностика

- **Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ)** (смесь четырех дНТФ, являющихся материалом для синтеза новых комплементарных цепей ДНК)
- **Фермент Таq-полимераза** - термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путем последовательного присоединения нуклеотидных оснований к растущей цепи синтезируемой ДНК
- **Буферный раствор** - реакционная среда, содержащая ионы Mg^{2+} , необходимые для поддержания активности фермента

Молекулярно-генетическая диагностика

- Для получения достаточного количества копий искомого характеристического фрагмента ДНК амплификация включает несколько (20-40) циклов.
- Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, протекающих в различных температурных режимах:

Молекулярно-генетическая диагностика

- **1 этап: Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали).** Протекает при 93-95^ов течение 30-40 сек.
- **2 этап: Присоединение праймеров (отжиг).** Присоединение праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 50-65^оС. Время отжига - 20-60 сек.

Молекулярно-генетическая диагностика

- **3 этап: Дистраивание цепей ДНК.**
Комплементарное дистраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ). Процесс синтеза катализируется ферментом термостабильной ДНК-полимеразой (Тақ-полимеразой) и проходит при температуре 70-72°C.

Молекулярно-генетическая диагностика

- Время протекания синтеза - 20-40 сек. Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (ампликона). В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей. Таким образом происходит накопление ампликонов в растворе по формуле 2^n , где n -число циклов амплификации .

Молекулярно-генетическая диагностика

- Даже если в исходном растворе первоначально находилась только одна двухцепочечная молекула ДНК, то за 30-40 циклов в растворе накапливается около 10^8 молекул ампликона. Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции этого фрагмента методом электрофореза в агарозном геле. Процесс амплификации проводится в специальном программируемом термостате (амплификаторе), который по заданной программе автоматически осуществляет смену температур согласно числу циклов амплификации.



Молекулярно-генетическая диагностика

- В основе метода ПЦР, как инструмента лабораторной диагностики инфекционных заболеваний лежит обнаружение небольшого фрагмента ДНК возбудителя (несколько сот пар оснований), специфичного только для данного микроорганизма, с использованием полимеразной цепной реакции для накопления искомого фрагмента.

Методика проведения анализа с использованием метода ПЦР

- включает три этапа:
- - Выделение ДНК (РНК) из клинического образца
- - Амплификация специфических фрагментов ДНК
- - Детекция продуктов амплификации

Выделение ДНК (РНК)

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

Амплификация специфических фрагментов ДНК

- Происходит накопление коротких специфических фрагментов ДНК в количестве, необходимом для их дальнейшей детекции.

Детекция продуктов амплификации

- Проводится разделение смеси продуктов амплификации, полученной на 2-ой стадии, **методом горизонтального электрофореза в агарозном геле**. До проведения электрофоретического разделения, к амплификационной смеси добавляется раствор бромистого этидия, образующий с двухцепочечными фрагментами ДНК прочные соединения внедрения. Эти соединения под действием УФ-облучения способны флуоресцировать, что регистрируется в виде оранжево-красных светящихся полос после электрофоретического разделения амплификационной смеси в агарозном геле.

Детекция продуктов амплификации

- В качестве альтернативы электрофоретическому методу детекции, имеющему некоторые недостатки: субъективность чтения результатов
- - ограничения по определению ДНК различных микроорганизмов в одной реакции, могут быть предложены **фотометрические схемы детекции.**

Детекция продуктов амплификации

- В этих схемах образующийся в результате амплификации фрагмент ДНК гибридизуется (образует 2-х цепочечные комплексы - "гибриды") со специфическим олигонуклеотидным зондом, который разрушается нуклеазной активностью Taq-полимеразы. Регистрация разрушения таких зондов может быть проведена флуориметрически.

Преимущества метода ПЦР

- **Прямое определение наличия возбудителей**
- **Высокая специфичность**
- Высокая специфичность метода ПЦР обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК.

Преимущества метода ПЦР

- **Высокая чувствительность**
- Метод ПЦР позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. ПЦР-диагностика обнаруживает наличие возбудителей инфекционных заболеваний в тех случаях, когда другими методами (иммунологическими, бактериологическими, микроскопическими) это сделать невозможно. Чувствительность ПЦР-анализа составляет 10-1000 клеток в пробе (чувствительность иммунологических и микроскопических тестов - 10^3 - 10^5 клеток).

Преимущества метода ПЦР

- **Универсальность процедуры выявления различных возбудителей.**
- **В качестве исследуемого материала могут использоваться различные биологические выделения (слизь, моча, мокрота), соскобы эпителиальных клеток**

Преимущества метода ПЦР

- **Высокая скорость получения результата анализа**
- **Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций**

Преимущества метода ПЦР

- **Высокая скорость получения результата анализа**
- **Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций**

Недостатки метода ПЦР

- **1. Амплифицируется ДНК как живого, так и погибшего микроорганизма.** Это налагает определенные требования при использовании ПЦР для контроля эффективности лечения. Контроль должен проводиться спустя промежуток времени, в течение которого происходит полная элиминация возбудителя. Однако, метод NASBA выявляет РНК только живых микроорганизмов и позволяет избежать этих ограничений.

Недостатки метода ПЦР

- **2. Высокая чувствительность.** Ряд микроорганизмов (условно - патогенная флора, УПФ) в норме может существовать у человека в малом количестве. При помощи метода ПЦР определяются даже самые малые количества УПФ, даже при отсутствии патологии. Однако эта проблема решена с появлением метода количественного определения ДНК (Real-time PCR).

Недостатки метода ПЦР

- **3. Различия при использовании разных тест систем.**
- Для амплификации можно использовать различные участки генома возбудителя. Однако в случае различных мутации микроорганизмов возможно изменение или утрата генов. Это приводит к разным результатам при использовании тест систем разных производителей.

Принцип метода ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR)

- основан на детекции продуктов амплификации уже в процессе реакции и проведении мониторинга кинетики накопления ампликонов. Учет результата ПЦР (числа ампликонов) происходит после каждого цикла амплификации, а не в конце, как при обычной ПЦР. Чем больше в исходной пробе было специфической ДНК, тем раньше и больше увеличится число специфических фрагментов. Данный способ детекции является альтернативой электрофоретическому методу.

Преимущества:

- **1. Высокая специфичность** детекции обусловленная применением гибридационной схемы с использованием высокоспецифичных олигонуклеотидных зондов
- **2. Исключение вероятности контаминации.** Возможность проведения реакции амплификации и детекции *в одном приборе*, что исключает риск контаминации ампликонами и значительно сокращает риск ошибки оператора.

Преимущества:

- **3. Возможность количественной оценки исходной ДНК матрицы**
- **4. Возможность анализа точечных мутаций**
- **5. Регистрация и учет данных в электронном формате.**

Общие правила получения биологического материала

- Биологический материал целесообразно получать до начала антимикробной терапии, если это невозможно – перед непосредственным введением антимикробного препарата.
- Материал для бактериологического исследования берут непосредственно из очага инфекции или исследуют клинически значимый биологический материал.

Общие правила получения биологического материала

- Необходимо соблюдать асептику, избегая контаминации биологического материала нормальной микрофлорой.
- Количество материала должно быть достаточным для корректного проведения всех необходимых тестов.

Общие правила получения биологического материала

- Собирают материал в стерильную посуду с пробками, полученную в микробиологической лаборатории:
- - для взятия отделяемого из раны, мазков со слизистых оболочек глаза, уха, носа, зева, цервикального канала, влагалища, анального отверстия следует использовать стерильные ватные тампоны, приготовленные в лаборатории или коммерческие транспортные среды

Общие правила получения биологического материала

- - для гноя, спинномозговой жидкости и экссудатов используют стерильные шприцы и специализированные транспортные среды
- - для мокроты, мочи и кала - стерильные плотно закрывающиеся небьющиеся контейнеры.
- **Внимание:** *необходимо следить за сроками годности посуды, полученной в лаборатории*

Общие правила получения биологического материала

- *Если посуда, стерилизуемая в лаборатории, не использована в срок, указанный на этикетках, её необходимо вернуть в лабораторию для повторной стерилизации*
- Нативный материал доставляют в лабораторию в максимально короткие сроки (для большинства образцов не позднее 1,5-2 ч после их получения)
- При использовании транспортных сред биологический материал можно хранить в течение 48 ч

Общие правила получения биологического материала

- Для исследования на анаэробы биологический материал необходимо помещать в анаэробные условия (можно доставлять в шприце)

Общие правила получения биологического материала

- Для жидких образцов используют специальные флаконы с жидкой питательной средой, заполненные газовой смесью определенного состава, куда из шприца уколом иглы через резиновую, плотно завальцованную крышку вносят материал.

Общие правила получения биологического материала

- Транспортировка осуществляется в пластиковых контейнерах, которые должны легко подвергаться обработке. *Пробы рекомендуется помещать в герметично закрытый контейнер, помещенный в соответствующий отдел пластикового мешка (сумки), защищенный от проливания жидкостей.*

Общие правила получения биологического материала

- К материалу прилагают сопроводительный документ, где указывают :
 - наименование, источник и метод получения биологического материала, дату и время его взятия
 - ФИО, пол и возраст больного
 - название учреждения, отделения, № палаты

Общие правила получения биологического материала

- предполагаемый диагноз инфекционной патологии и предшествующую антибактериальную терапию;
- фамилию и подпись врача, направившего материал для проведения бактериологического исследования.

Общие правила получения биологического материала

- **Внимание:** *погрешности в правилах сбора материала для микробиологического исследования приводят к ошибкам в диагностике возбудителя и определении его антибиотикочувствительности.*

Дисбактериоз кишечника

- Клинико-лабораторный синдром, связанный с изменением качественного и количественного состава микрофлоры кишечника с последующим развитием метаболических и иммунологических нарушений с возможным развитием желудочно-кишечных расстройств.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МИКРОБИОЦЕНОЗА КИШЕЧНИКА

Группа микроорганизмов	Количество микроорганизмов в 1 г фекалий	
	у взрослых	у детей
Бифидобактерии	10^8-10^{10}	10^9-10^{10}
Бактероиды	10^8-10^{10}	$< 10^8$
Молочнокислые палочки	10^6-10^7	10^6-10^8
Молочнокислый стрептококк	10^6-10^7	10^7-10^8
Энтерококки.	10^5-10^6	10^6-10^7
Эшерихии:		
с нормальной ферментативной активностью	10^7-10^8	10^7-10^8
со сниженной ферментативной активностью	10^6-10^7	10^6-10^7
лактозонегативные	10^6-10^7	10^6-10^7
Микробы рода Proteus	$< 10^4$	$< 10^3$
Другие условно патогенные энтеробактерии	$< 10^4$	$< 10^4$
Стафилококки (сапрофитический, эпидермальный)	$< 10^4$	10^4-10^6
Дрожжеподобные грибы	$< 10^4$	$< 10^4$
Спороносные анаэробные палочки (кlostридии)	$< 10^5$	-

Дисбактериоз кишечника

- Показания для исследования :
- - длительно протекающие кишечные расстройства
- - затянувшийся период реконвалесценции после о.к.з
- - дисфункция кишечника у лиц, длительно подвергшихся воздействию АБТ и иммуносупрессивной терапии, длительной химиотерапии, гормонотерапии и т.д.

Дисбактериоз кишечника

- - наличие бактериемии, гнойно-воспалительных очагов, трудно поддающихся лечению
- - предоперационный период у лиц с факторами риска развития дисбактериоза кишечника
- - аллергические заболевания, трудно поддающиеся лечению.

Дисбактериоз кишечника

- Диагноз основывается на результатах клинического обследования пациента и данных микробиологического исследования кала. Т.к в ряде случаев он протекает бессимптомно, решающее значение имеют микробиологические показатели.

На дисбактериоз толстого кишечника указывают:

1. снижение количество бифидобактерий до уровня менее 10^8 КОЕ/мл
2. увеличение доли атипичных эшерихий до более чем 10%;
3. появление гемолитической микрофлоры;
4. увеличение числа условно-патогенных грамотрицательных палочек или *S.aureus* (более 10^4 КОЕ/мл);
5. увеличение числа грибов рода Кандида (более 10^3 КОЕ/мл);
6. увеличение до более $2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл или снижение до 10^6 КОЕ/мл количества *E.Coli*

ПОСЕВ ФЕКАЛИЙ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ НА ДИСБАКТЕРИОЗ

Среды	Разведения	Микроорганизмы
Мюллера, селенитовая, магниевая	Без разведения	Патогенные энтеробактерии
Среда Блаурока	10^{-3} - 10^{-10}	Бифидобактерии
Агар Хенеля (анаэробные условия)	10^{-3} - 10^{-7}	Бактероиды
Лактобакагар (анаэробные условия)	10^{-3} - 10^{-7}	Лактобациллы и стрептококки
Среда Калины	10^{-3} - 10^{-5}	Энтерококки
Желточно-солевой агар	10^{-3} - 10^{-5}	Стафилококки
Среда Сабуро	10^{-3} - 10^{-5}	Грибы рода Кандида
Среда Эндо	10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7}	Энтеробактерии
Малахитовый агар	10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7}	Синегнойная палочка
Кровяной агар	10^{-5} , 10^{-7}	Гемолизирующие культуры
Среда Вильсон-Блер(или Шадлера)	10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7}	Клостридии

Классификации дисбактериоза по степени тяжести

1 степень	Латентная, компенсированная форма. Характеризуется незначительными изменениями в аэробной части микробиоценоза (увеличение или уменьшение количества кишечных палочек). Бифидо- и лактофлора неизменны. Кишечные дисфункции, как правило, не регистрируются.
2 степень	Субкомпенсированная форма. На фоне незначительного снижения количественного содержания бифидобактерий выявляются количественные и качественные изменения кишечной палочки или других условно-патогенных микроорганизмов.
3 степень	Значительное снижение уровня бифидофлоры (10^5 - 10^7 кл./г) в сочетании со снижением лактофлоры и низким содержанием кишечных палочек. Как правило, сопровождаются кишечными дисфункциями.
4 степень	Отсутствие бифидофлоры, значительное уменьшение лактофлоры и изменение количества кишечной палочки (снижение или увеличение), возрастание численности условно-патогенных бактерий. Выраженные клинические проявления.

Дисбактериоз кишечника

- *Диагноз дисбактериоза устанавливается повторным (с интервалом в 5–7 дней) бактериологическим исследованием материала, взятого из того или иного биотопа. При этом количественная оценка результатов определения видов и вариантов, обнаруживаемых микроорганизмов, входящих в состав обследуемого биоценоза, является обязательной.*

Методы изучения микрорбиоценоза кишечника:

- 1. Микроскопия нативного и убитого материала.
- 2. Электронномикроскопическое исследование биопленки.
- 3. Гистохимические, морфологические и комбинированные методы исследования биоматериалов.

Методы изучения микрорбиоценоза кишечника:

- 4. Микробиологическое определение состава микроорганизмов, присутствующих в биоматериале.
- 5. Селективная изоляция м/о, характерных только данному биотопу или не свойственных ему.
- 6. Биотипирование микроорганизмов, изолированных из материала, и определение сроков их хранения.

Методы изучения микрорбиоценоза кишечника:

- 7. Определение состава микробных метаболитов в биоматериале.
- 8. Селективное определение микробных метаболитов, характерных только для данного эпитопа или не свойственных ему.

Методы изучения микрорбиоценоза кишечника:

- 9. Постановка нагрузочных проб с индикаторными м/о и определение продуктов их метаболизма.
- 10. Постановка нагрузочных проб с индикаторными химическими соединениями и определение продуктов их метаболизма.
- 11. Молекулярно-генетические методы исследования микробной экологии.

- Необходимо напомнить, что нормальная микрофлора играет большую роль в качестве и продолжительности жизни человека, поэтому важным вопросом в микробиологии, является вопрос о методах выявления и коррекции ее дисбаланса.

Корррекция дисбиотических изменений

- должна быть комплексной и *направленной в основном на:*
- • выявление и устранение причин его развития;
- • восстановление состава нормальной микрофлоры.
- Подход к назначению коррегирующей терапии при микробиологическом диагнозе «дисбактериоз» должен быть строго индивидуальным.

Корррекция дисбиотических изменений

- **пробиотики** – это живые, специально подобранные штаммы микроорганизмов или специфические субстанции микробного, растительного или животного происхождения. При естественном введении в организм они благоприятно влияют на его индигенную микрофлору, корригируя ее, в конечном итоге на физиологические функции и биохимические реакции хозяина.

Корррекция дисбиотических изменений

- Недавно предложено относить к пробиотикам только те пищевые добавки, которые связаны с живыми микроорганизмами. Другие пищевые добавки, селективно стимулирующие рост и размножение так называемых “дружественных человеку и животным бактерий”, принято обозначать **пребиотиками**, а комбинированные препараты (пробиотик + пребиотик) - **симбиотиками**.

Корррекция дисбиотических изменений

- Наиболее логичной коррекцией состава микрофлоры при дисбактериозе выглядит ***заместительная терапия*** живыми бактериями, населяющими толстый кишечник.

Корррекция дисбиотических изменений

- *К наиболее известным в настоящее время такого рода препаратам относятся:*
 - • бифидумбактерин
 - • колибактерин
 - • бификол (комбинированный препарат из двух предыдущих)
 - • эубактерин
 - • лактобактерин
 - • бактисуптил
 - • энтерол

Корррекция дисбиотических изменений

- • бифи-форм (комбинированный препарат из бифидобактерий и энтерококков – *Enterococcus faecalis*)
- • линнекс
- • мутафлор
- • нормофлор
- • бифилакт и другие.

Корррекция дисбиотических изменений

- Однако применение *пробиотиков* для лечения больных с дисбактериозом не всегда достигает клинического успеха. Установлено, что *входящие в эти препараты микроорганизмы* в организме человека стойко, как правило, *не приживаются*. После прекращения поддерживающей терапии *искусственно введенные штаммы быстро элиминируются из кишечника* .

Проблемы качественной диагностики возбудителя

- 1.нехватка сертифицированных лабораторий
- 2.отсутствие оборудования, необходимого для экспресс-диагностики
- 3.отсутствие единых стандартов диагностики в микробиологических лабораториях

Проблемы качественной диагностики возбудителя

- 4. частое несоблюдение методик взятия и условий доставки биоматериалов в лабораторию, а также – методик их исследования.
- 5. недостаточная кооперация в работе врача-клинициста и микробиолога

**Благодарю за
внимание!**

