

ЛЕКЦИЯ 2: МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИИ



1.СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (краткий обзор)

- микроскопический — при индикации и прямом подсчете микроорганизмов в исследуемом объекте;
- бактериологический — выделение микроорганизмов и их идентификация (**ЧИСТАЯ КУЛЬТУРА**);
- биологический — заражение чувствительных животных;
- ускоренные методы исследований (РИФ (МФА), ПЦР и др.).

Микроскопический (и в комбинации)

Любые объекты. От почвы до содержимого кишечника. Продукты питания: Мясо (сальмонеллы, гнилостные), молоко (гнилостные), готовая продукция, которая не должна содержать бактерии.

Бактериологический: Классический и тестовый

Биологический - при исследовании на токсичность и патогенность

Наборы для бактериологических исследований

1. ЭНТЕРОБАКТЕРИИ

(ПБДЭ) Пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерии. Предназначена для энзимоидентификации энтеробактерий по 20 биохимическим признакам.

Время анализа – 18-22 ч.

1.Набор реагентов для идентификации энтеробактерий по 12 биохимическим признакам до вида.

2.Набор реагентов для идентификации энтеробактерий до вида по 24-м биохимическим признакам. Набор адаптирован и может быть использован в компьютерных идентификационных программах «Микроб-Автомат», «Микроб-2" и к фотометрам IEMS-reader, Multiscan-Ascent для автоматического прочтения результатов.

2. ДС-ДИФ-САЛЬМОНЕЛЛА

Набор реагентов для идентификации и межвидовой дифференциации микроорганизмов рода Salmonella по 8 биохимическим тестам

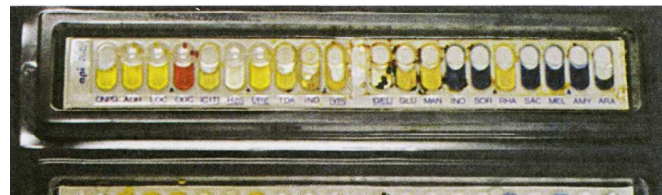
3. СТАФИЛОКОККИ

ПБДС Пластина биохимическая, дифференцирующая стафилококки. Предназначена для энзимоидентификации стафилококков по 17 биохимическим признакам.

4. КОРИНЕБАКТЕРИИ

ДС-ДИФ-КОРИНЕ Набор №1 для дифференциации микроорганизмов рода Corynebacterium, в том числе возбудителя дифтерии, до вида по 9-ти биохимическим признакам и определения токсигенных свойств.

5.Программное обеспечение для автоматизированной идентификации бактерий ПО предназначено для компьютерной интерпретации результатов биохимического тестирования штаммов микроорганизмов разных таксономических групп (энтеробактерий, стафилококков, коринебактерий, неферментирующих бактерий, сальмонелл).



Ускоренные методы



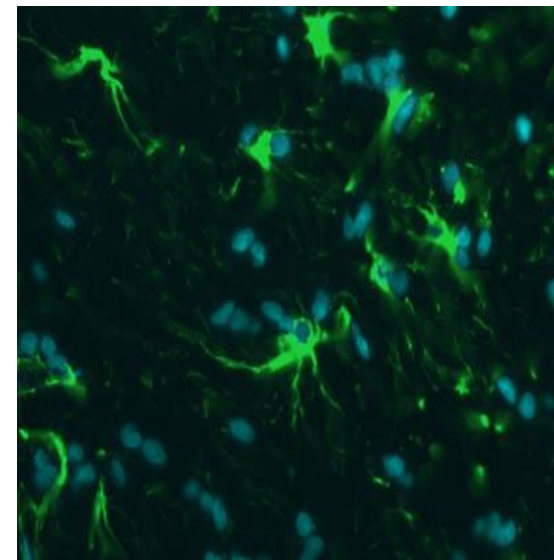
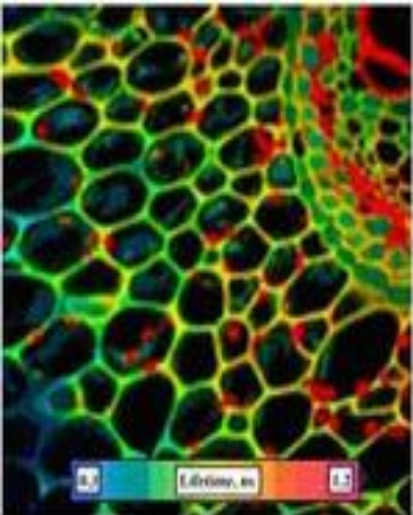
МФА-- Сущность метода флуоресцирующих антител заключается в визуализации реакции антиген-антитело люминесцентными маркерами. Метод конъюгации глобулинов с органическими флуорохромами разработан в 1942 году [А. Кунсом](#).

Различают МФА *прямой*, разработанный А. Кунсом и Мелвином Капланом, МФА *непрямой*, разработанный А. Кунсом и Уиллером и *непрямой МФА с комплементом*.

При прямом методе (**пМФА**) на препарат с антигеном наносят известную, предположительно соответствующую ему, люминесцирующую сыворотку. В случае образования комплекса, он обнаруживается, люминесцентной микроскопией в виде зеленоватого свечения разной степени интенсивности и четкости.

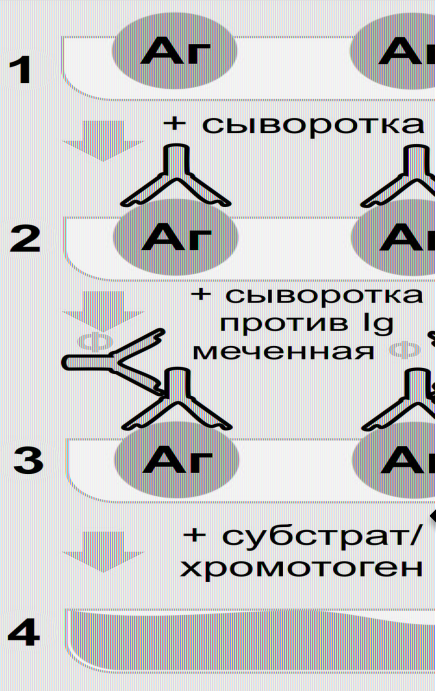
При непрямом методе (**нМФА**) на мазок из наслоения антигена и немеченой сыворотки наносят антиглобулиновую (видовую по отношению к диагностической сыворотке) люминесцирующую сыворотку. В случае образования комплекса антиген-антитело, последний компонент реагирует с видовой антиглобулиновой люминесцирующей сывороткой. При нМФА с комплементом, его добавляют к комплексу антиген-антитело и идентифицируют образование тройного комплекса по люминесцирующей антикомплементарной сыворотке.

Результаты описываются в так называемых «крестах» (от одного + до четырех +++) — субъективная градация исследователем степени выраженности реакции. Непрямые методы требуют наличия только антиглобулиновых видовых сывороток с флуорохромами, но при этом необходимо большое количество тестовых контролей. При постановке прямым методом делается только один контроль, но требуется множество моноспецифических сывороток. Недостатками всех видов МФА является ограниченная чувствительность из-за наличия возможных перекрестных реакций между близкими по антигенному составу объектами и неспецифическая флуоресценция вследствие адсорбции флуоресцирующих глобулинов на различных элементах препарата. В настоящее время используются коммерческие стандартные конъюгаты, содержащие глобулины к исследуемым антигенам



ИФА- ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Иммуноферментный анализ или метод – выявление антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой. После соединения антигена с меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат-хромоген. Субстрат расщепляется ферментом и **изменяется цвет продукта реакции** – интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител. ИФА применяют для диагностики вирусных, бактериальных и паразитарных болезней, в частности для диагностики ВИЧ-инфекций, гепатита В и др., а также определения гормонов, ферментов, лекарственных препаратов и других биологически активных веществ, содержащихся в исследуемом материале.



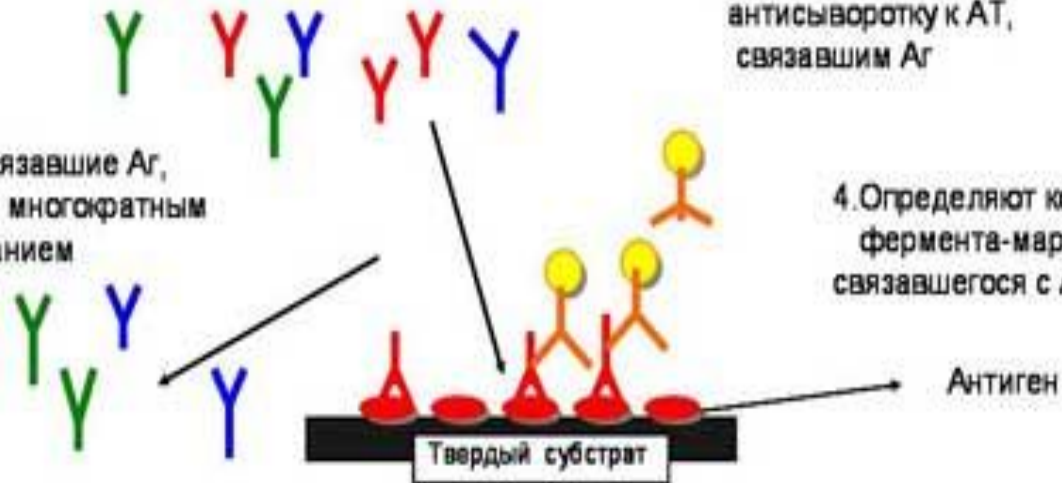
Прямой твердофазный ИФА (схема)

1. Сыворотку инкубируют с Ag, фиксированным на твердом субстрате (пластиковая микропланшетка)

2. AT, не связавшие Ag, удаляют многократным промыванием

3. Вносят меченную ферментом антисыворотку к AT, связавшим Ag

4. Определяют количество фермента-маркера, связавшегося с AT

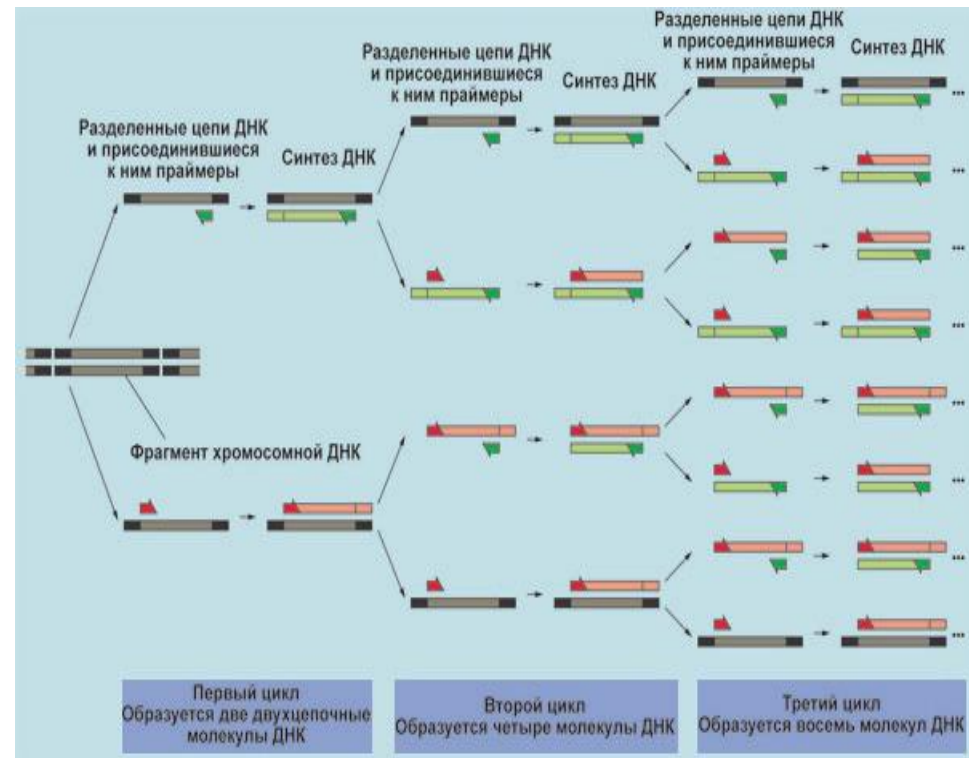
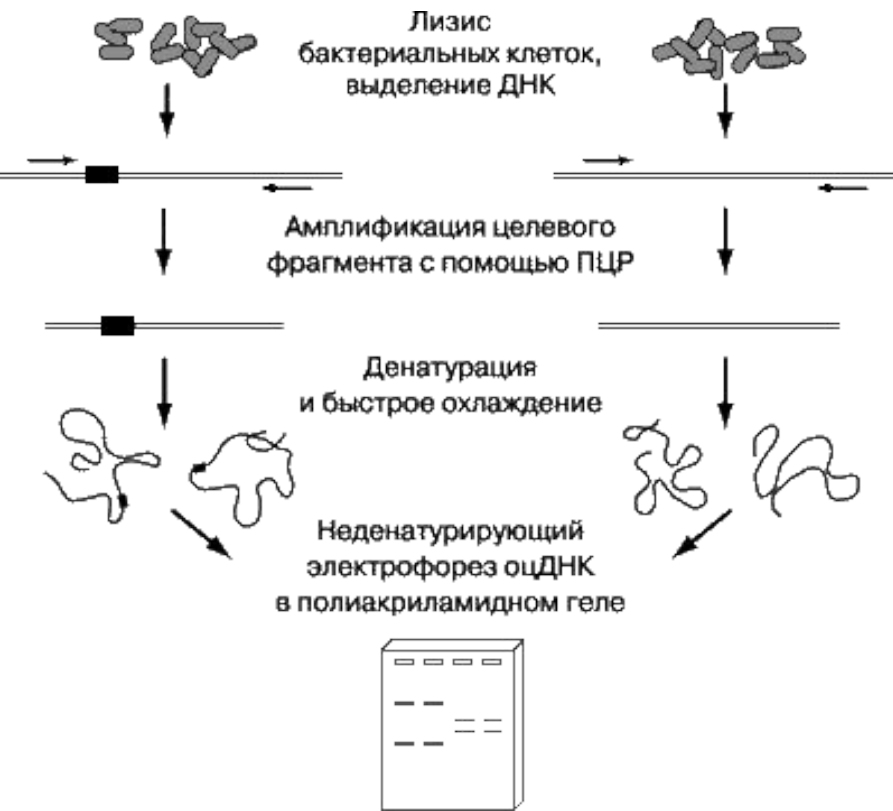
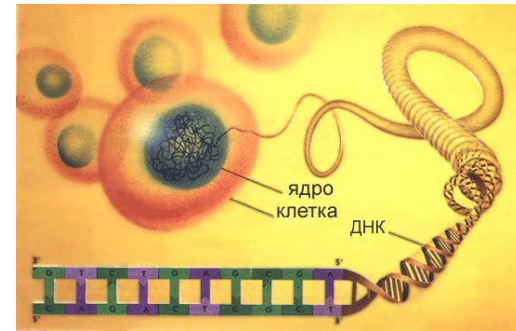


Аппарат для ИФА

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) —

экспериментальный метод [молекулярной биологии](#), позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты ([ДНК](#)) в биологическом материале (пробе).

Помимо [амплификации](#) ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение [мутаций](#), сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для [клонирования генов](#), выделения новых [генов](#).



Масс-спектрометрия

MALDI TOF — экспресс-метод быстрой и надежной видовой идентификации микроорганизмов, базирующийся на применении MALDI- Biotyperмасс-спектрометра, интегрированного с обширной базой данных (на данный момент 4111) микроорганизмов.

Новизна и практическая значимость разработки заключается в адаптации и внедрении в микробиологическую практику нового молекулярно-биологического метода «**Прямое белковое профилирование**». Метод позволяет в быстрые сроки получить ответ о видовой принадлежности идентифицируемого микроорганизма.

Данный метод позволяет идентифицировать микроорганизмы в пищевых продуктах, в патологическом и клиническом материале от павших и больных животных, а также в объектах окружающей среды (вода, почва).

Использование масс-спектрометра MALDI Biotyper позволяет снизить количество специалистов, задействованных ранее в этой работе, в связи с отсутствием работы в боксе. Также данный метод дает возможность сократить время идентификации микроорганизмов с 5 суток (классические методы) до 1 дня.

Масс-спектрометрия (масс-спектроскопия, масс-спектрография, масс-спектральный анализ, масс-спектрометрический анализ) — метод [исследования вещества](#) путём определения отношения [массы](#) к [заряду](#) (качества) и количества заряженных частиц, образующихся при том или ином процессе воздействия на [вещество](#). **Изотопная масс-спектрометрия** углеродных атомов применяется для прямой диагностики инфекционных болезней (у человека [Helicobacter pylori](#)) и **является самым надёжным из всех методов диагностики**.

Масс-спектрометр — это [вакуумный](#) прибор, использующий физические законы движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях, и необходимый для получения масс-спектра.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ:

Диагностика инфекционных заболеваний человека и животных

Фундаментальные научные исследования

Разработка новых лекарств: анализ и сравнение белковых профилей бактериальных штаммов, устойчивых к лекарствам, для поиска новых мишеней фармакологического воздействия

Стандартизация микробиологических коллекций: быстрое сравнение и классификация штаммов из различных изолятов

Пищевая промышленность: анализ присутствия нежелательных микроорганизмов на ранних стадиях производства.

В микробиологических лабораториях уже широко используют автоматические и полуавтоматические анализаторы, с помощью которых идентифицируют бактерии и определяют минимальную ингибирующую концентрацию антимикробных препаратов для конкретного возбудителя. Однако следует отметить, что при этом на идентификацию микроба требуется не менее 18-24 часов («быстрые» панели позволяют провести идентификацию в течение 4-6 часов). Кроме того, после получения первичных колоний или бактериальной массы на жидкой питательной среде необходимо получить чистую культуру для использования в автоматическом анализаторе



затор
иоло-
ий
MS
I-TOF
ометр)

Что же такое **MALDI-TOF масс-спектрометрия**? Ниже даны описания ключевых терминов.

Масс-спектрометрия - метод идентификации молекул путем измерения отношения их массы к заряду (m/z) в ионизированном состоянии.

MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) - ионизация вещества с помощью матрицы и **лазерного излучения**.

TOF MS (*Time Of Flight Mass-Spectrometry*) - времяпролетная масс-спектрометрия. Масса молекулы оценивается по времени пролета от источника ионизации до детектора.

Для идентификации бактерий **Vitek MS (MALDI-TOF)** определяет спектр белков напрямую из бактериальной клетки без предварительной длительной пробоподготовки. Для каждого вида микроорганизмов сформирован характерный набор белков (биомаркеров), полученный на основе анализа не менее 50 масс-спектров этого вида. При этом образцы получены из различных источников (больниц, лабораторий, микробиологических коллекций), а каждый образец тщательно идентифицирован с помощью сиквенса 16s РНК или других сертифицированных методов анализа. Структурированная таким образом база данных позволяет быстро и точно идентифицировать микробиологические штаммы.

Вся методика идентификации на **Vitek MS (MALDI-TOF)** состоит из **2-х этапов**:

Этап 1: Подготовка образца

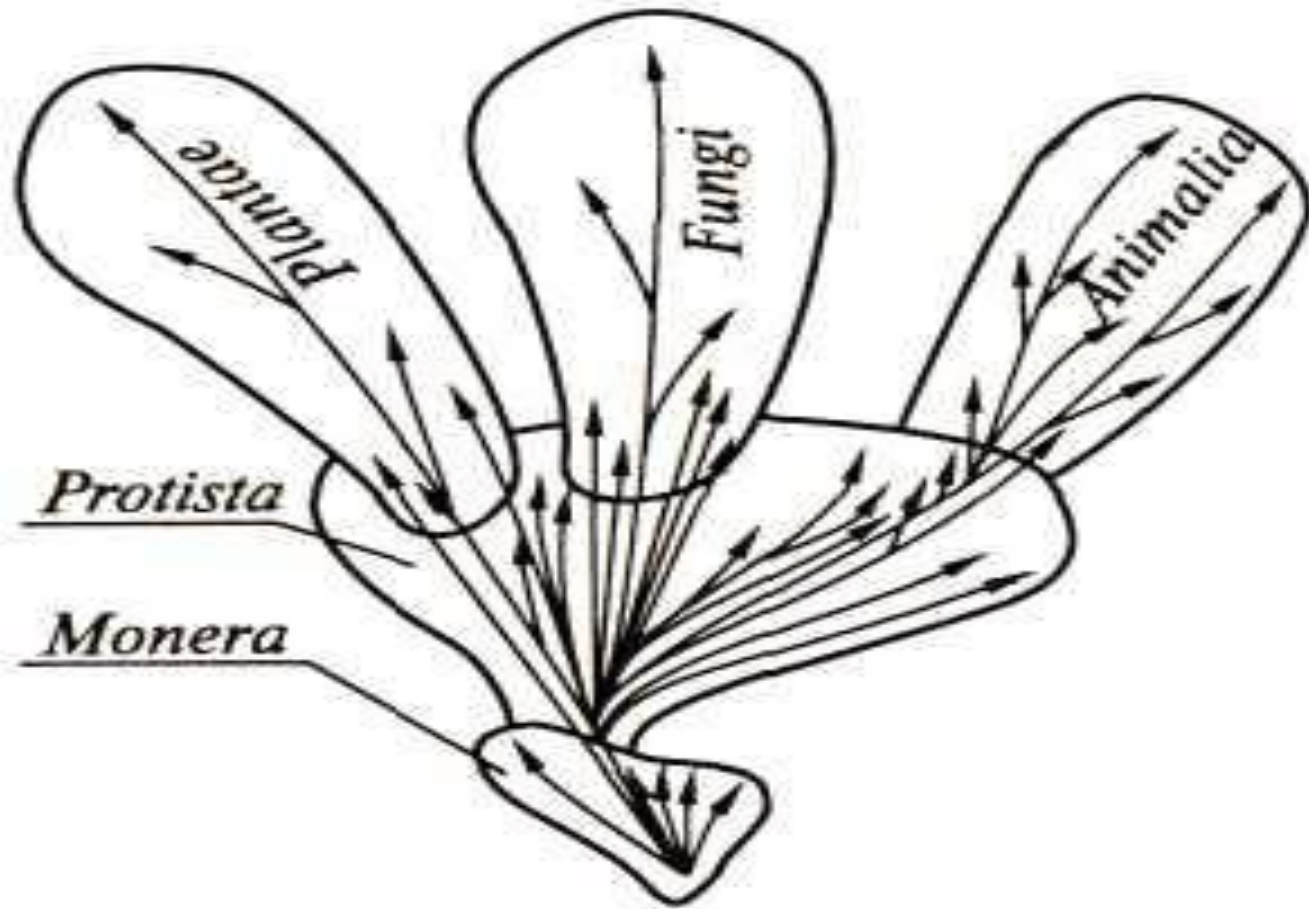
Анализ начинается с того, что на подложке масс-спектрометра смешивают биоматериал из колонии бактерий и специальную матрицу (2',5' дигидроксибензойная кислота), раствор уже готов к использованию и устойчив к свету). Затраты по времени для подготовки 24 изолятов - 10 минут, для 96 изолятов - 33 минуты.

Этап 2: Идентификация

После этого образец помещают в прибор и подвергают воздействию наносекундных лазерных импульсов. При этом молекулы матрицы и аналита (в частности, белки) переходят в газовую фазу, а протонированные молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд. Под действием электрического поля ионизированные белки движутся от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам. Программное обеспечение прибора оценивает время пролета частиц и преобразует эту информацию в спектр молекулярных масс (масс-спектр). Масс-спектр сравнивается со спектрами из базы данных, и на основании сведений о массах характеристических белков происходит идентификация микроорганизмов. Затраты по времени для идентификации 24 изолятов - 12 минут, для 96 изолятов - 43 минуты.

Таким образом, на идентификацию одного микроорганизма требуется меньше 2-х минут времени, при этом образцом может служить первичная колония! База данных Vitek MS состоит из 755 клинически значимых видов (бактерий, дрожжей, плесневых грибов/ дерматофитов, микобактерий) и покрывает большинство видов, встречающихся в ежедневной практике микробиологической лаборатории, и эта база постоянно пополняется.

2. Место микроорганизмов в живом мире



- **Схема пяти царств живого мира:** прокариоты (царство Monera), **одноклеточные эукариоты** (царство Protista), **многоклеточные эукариоты** (царства Plantae, Fungi, Animalia)

ВИРУСЫ

ДНК-содержащие

РНК-содержащие

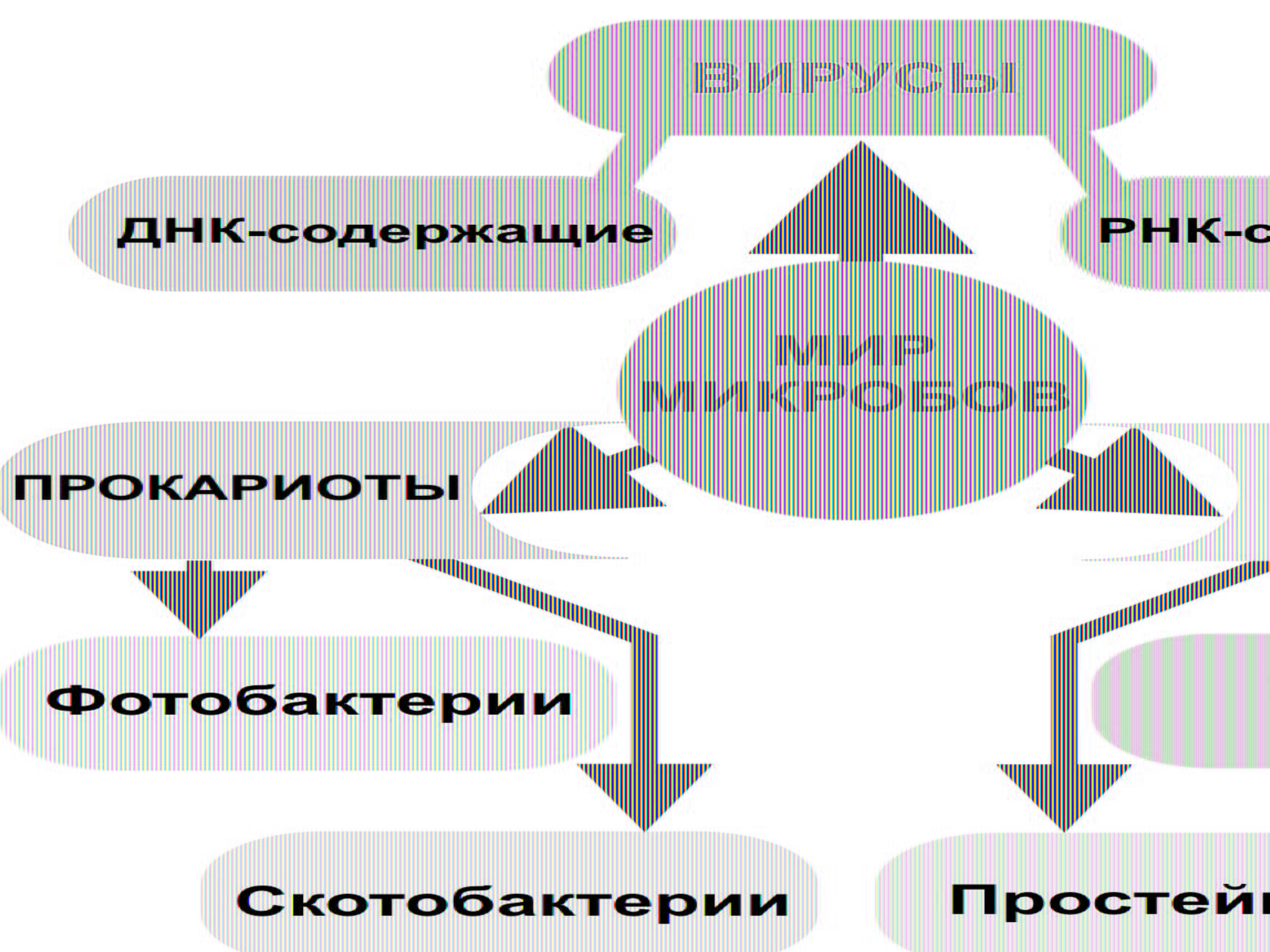
**МИР
МИКРОБОВ**

ПРОКАРИОТЫ

Фотобактерии

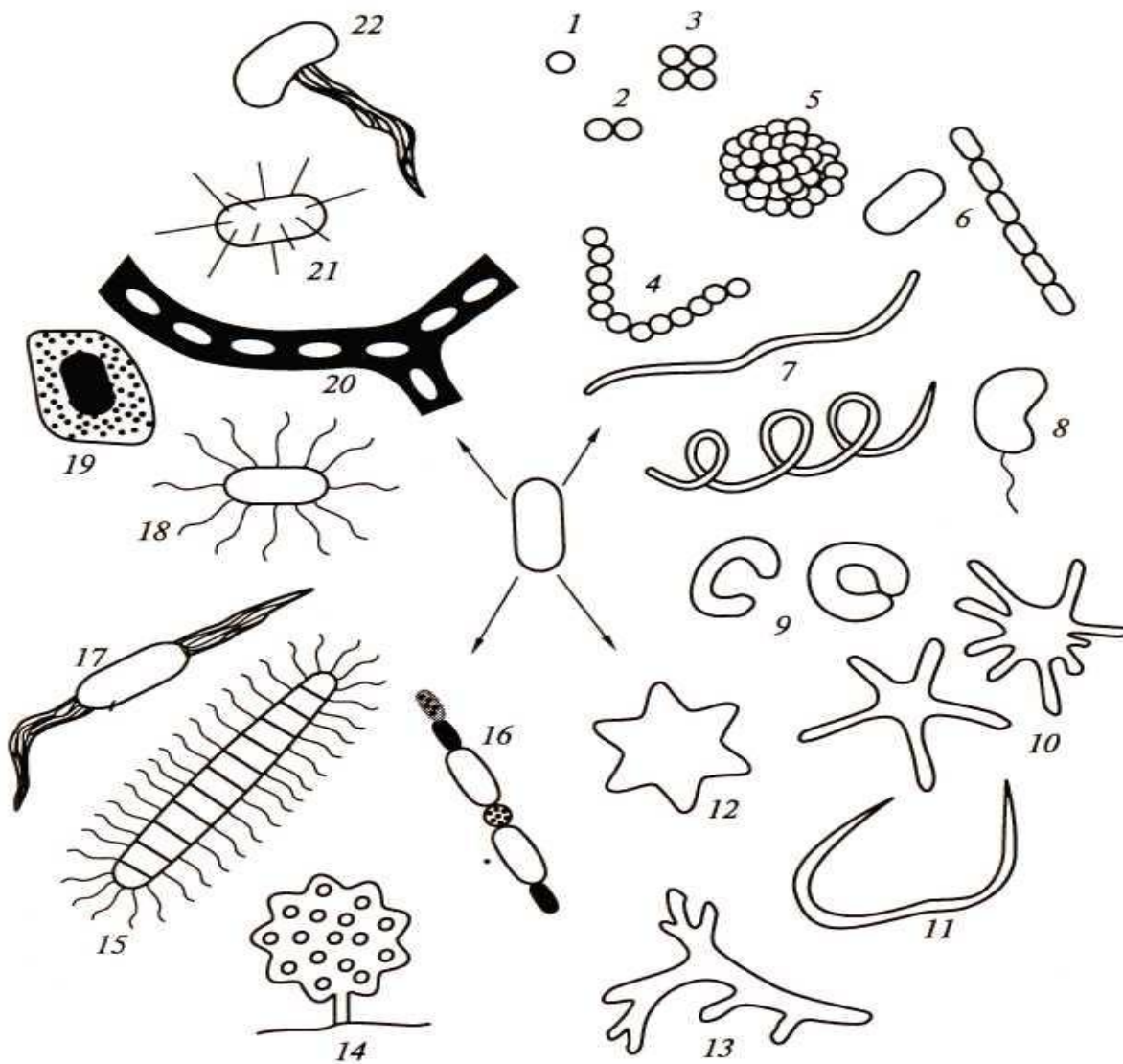
Скотобактерии

Простейшие



3. Отличительные особенности микроорганизмов

- 1. Микроскопические размеры.
- 2. Большое значение отношения суммы площади поверхности тел к их объёму.
- 3. Высокие темпы обмена веществ (по правилу Рубнера).
- 4. Ферменты индуцированные.
- 5. Обитают повсеместно.



Разнообразие форм прокариот:

1 — кокк; 2 — диплококк; 3 — сарцина; 4 — стрептококк; 5 — колония сферической формы; 6 — палочковидные бактерии (одиночная клетка и цепочка клеток); 7 — спириллы; 8 — вибрион; 9 — бактерии, имеющие форму замкнутого или незамкнутого кольца; 10 — бактерии, образующие выросты (простеки); 11 — бактерия червеобразной формы; 12 — бактериальная клетка в форме шестиугольной звезды; 13 — представитель актиномицетов; 14 — плодовое тело миксобактерии; 15 — нитчатая бактерия рода *Caryophanon* с латерально расположенными жгутиками; 16 — нитчатая цианобактерия, образующая споры (акинеты) и гетероцисты; 17, 18, 19 — бактерии с разными типами жгутикования; 20 — нитчатые бактерии группы *Sphaerotilus*, заключенные в чехол, инкрустированный гидратом окиси железа; 21 — бактерия, образующая шипы; 22 — *Gallionella sp.*

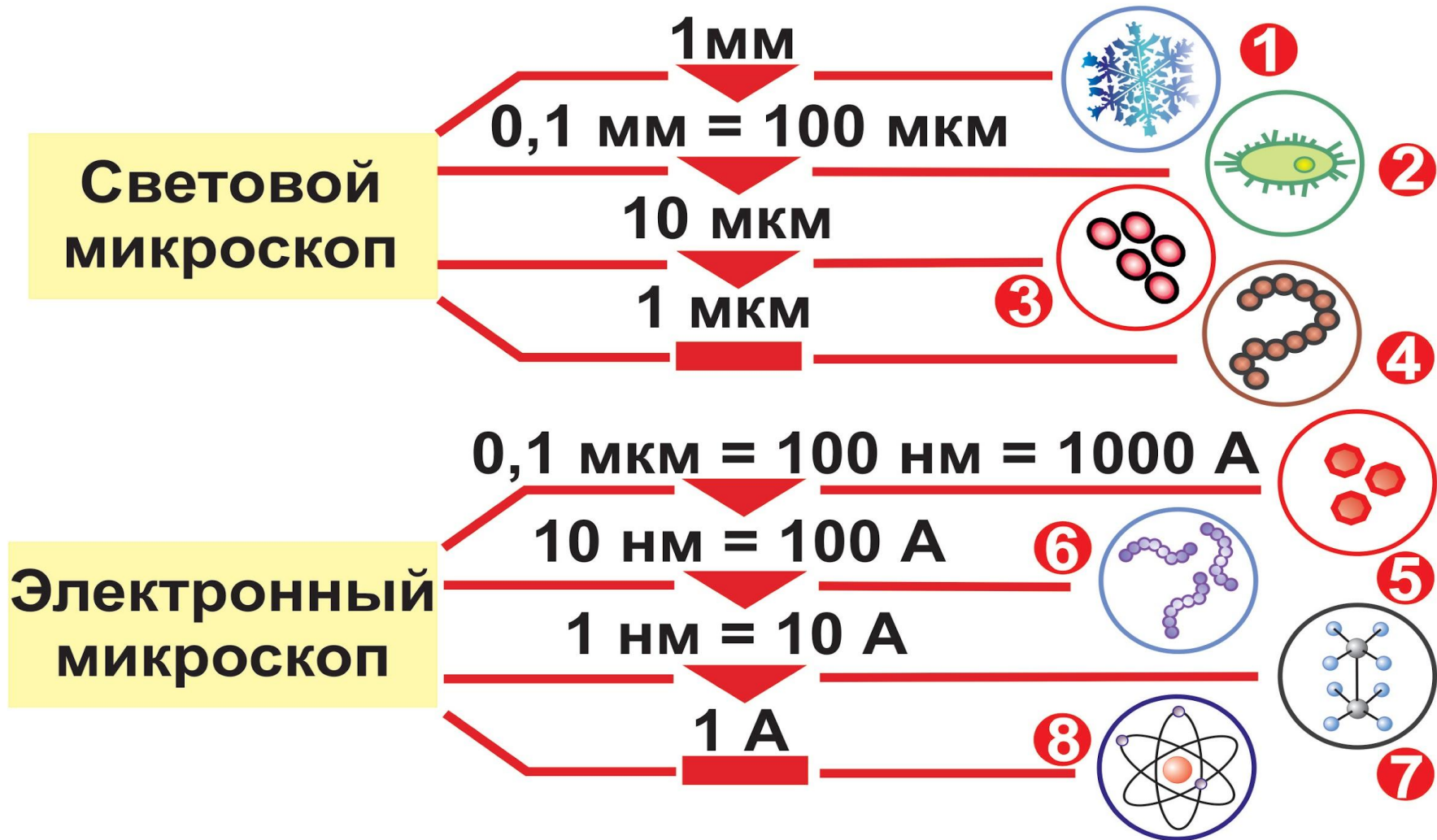
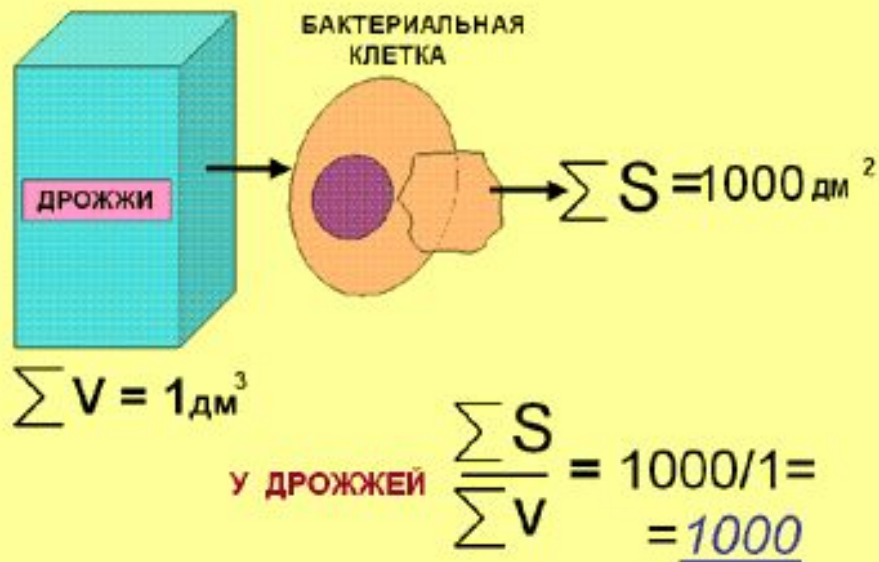


Рис. Размеры объектов

1- кристаллы льда; 2- растительная клетка; 3- клетки крови; 4- бактерии; вирусы; 6- вирусы растений; 7- молекулы; 8- атомы.

2. Отношение суммарной поверхности к общему объёму тел бактериальных клеток на несколько порядков больше, чем у ЖИВОТНЫХ

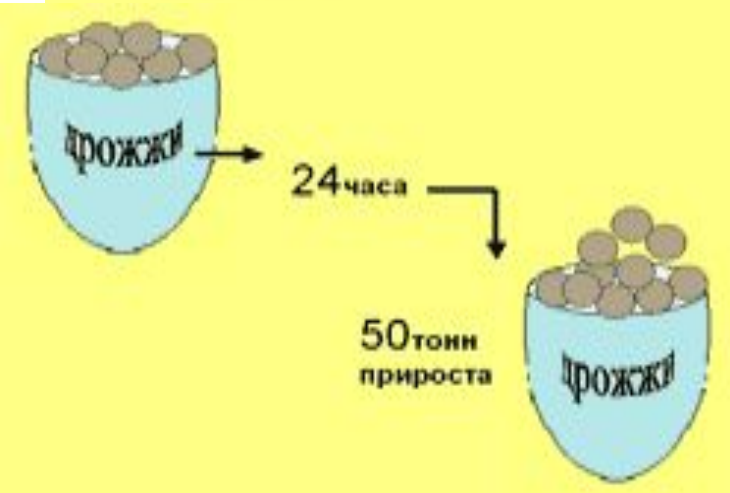
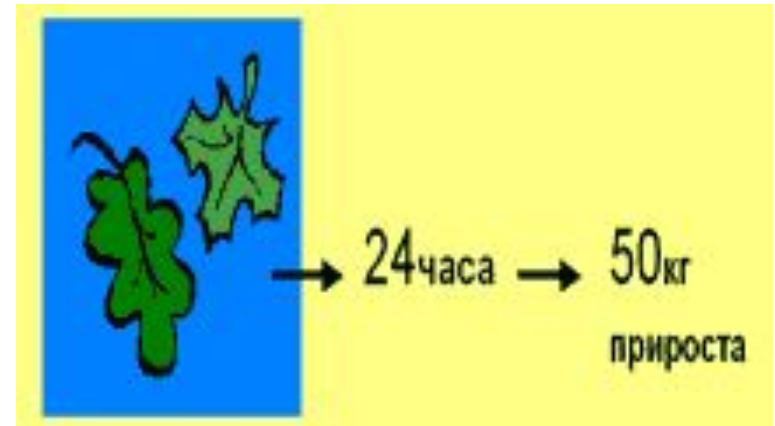
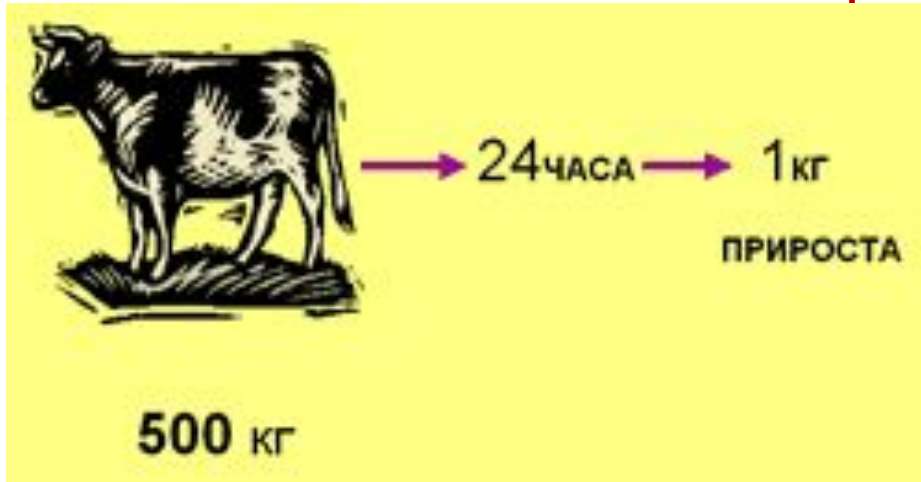


$$\sum V_{\text{ШКУРЫ}} = 10 \text{ дм}^3$$

$$\sum S = 30 \text{ дм}^2$$

У ЖИВОТНЫХ $\frac{\sum S}{\sum V} = 30/10 = \underline{3}$

3. Темпы обмена веществ и роста у бактерий в сравнении с растениями и животными соответственно в 1000 и 50 000 раз выше.



4. У высших организмов ферментный состав постоянный. Клетка микроорганизмов вырабатывает ферменты "по мере надобности", т.е. при наличии соответствующего субстрата и таким образом набор ферментов у микроорганизмов непостоянный. Многие ферменты у микроорганизмов индуцированные, т.е. образуются лишь при наличии в среде обитания соответствующего субстрата.

В 50 тысяч раз интенсивней, чем у животных

5. Распространены повсеместно

В недрах Земли

Candidatus Desulforudis audaxviator — уникальный вид экстремофильных анаэробных бактерий, живущих на глубинах от 1,5 км до 3 км ниже поверхности земли в подземных водах, способных существовать обособленно от каких-либо других живых организмов.

Описание

Desulforudis audaxviator была обнаружена в 2002 году в пробах воды в золотодобывающей шахте Мпоненг в Южной Африке недалеко от Йоханнесбурга на глубине 2,8 км. Длина *Desulforudis audaxviator* составляет приблизительно 4 мкм. Этот вид не нуждается в солнечном свете и получает энергию в ходе восстановительной реакции с участием сульфата (SO_4^{2-}) и водорода, образующегося в результате распада радиоактивных изотопов урана, тория и калия, содержащихся в горных породах. *Desulforudis audaxviator* не способна утилизировать кислород или хотя бы защищаться от его токсичного действия. Бактерия была изолирована от поверхности Земли в течение нескольких миллионов лет, приспособившись к выживанию в экстремальных условиях — при температурах более **+60 °C** и **pH 9,3**. Таким образом *Desulforudis audaxviator* является одновременно термофильным и алкалифильным микроорганизмом.

Desulforudis audaxviator является на сегодняшний день единственным видом, представляющим собой самодостаточную экосистему, способную самовоспроизводиться без всякого контакта с остальной земной биосферой. Поскольку окружающая среда на таких глубинах похожа на **раннюю Землю**, это даёт основания строить предположения о том, какие организмы существовали до возникновения кислородной атмосферы.

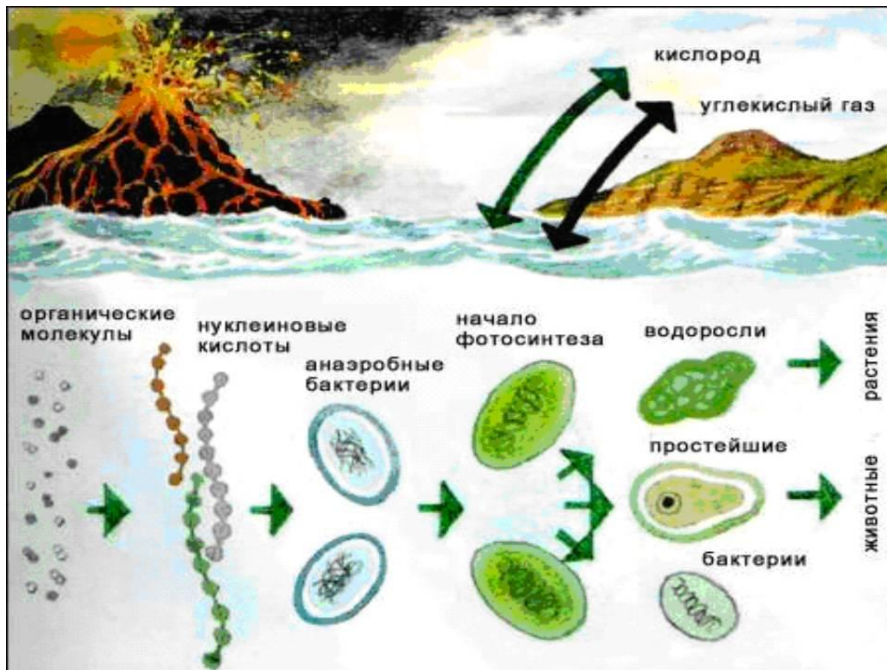
Космос (панспермия) и океан

Панспермия

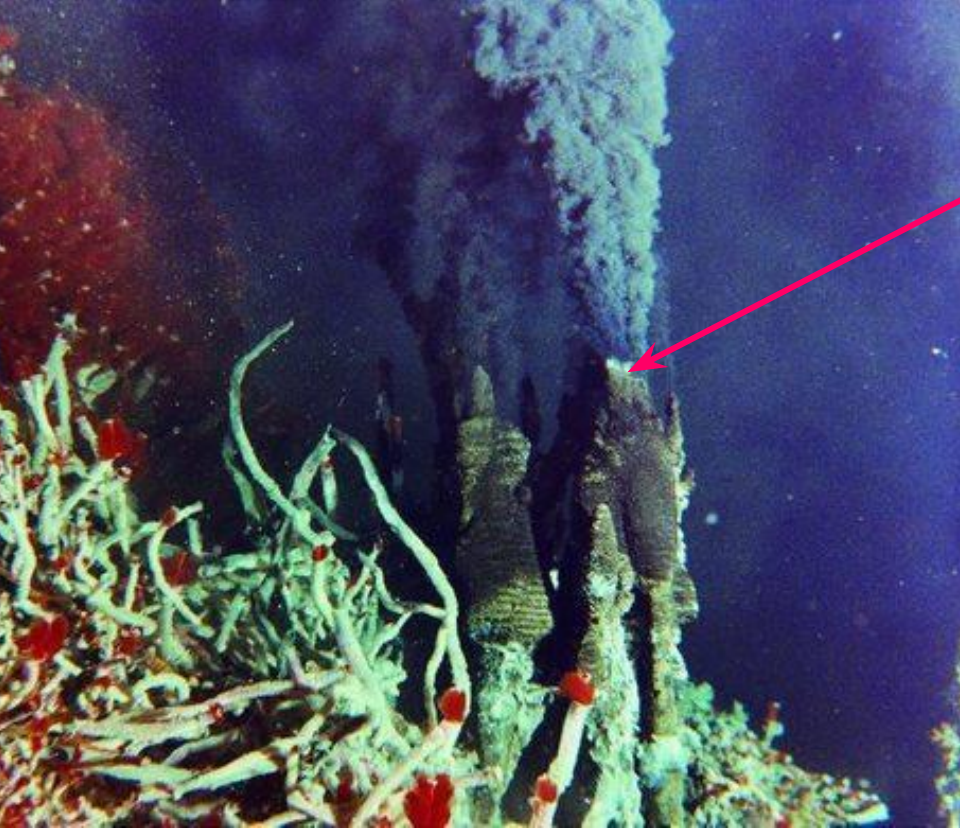
Панспермия (греч. Panspermia — смесь всяких семян, от παν (pan) — весь, всякий и σπέρμα (sperma) — семя) — гипотеза о появлении жизни на Земле в результате переноса с других планет неких «зародышей жизни».



Или эволюция

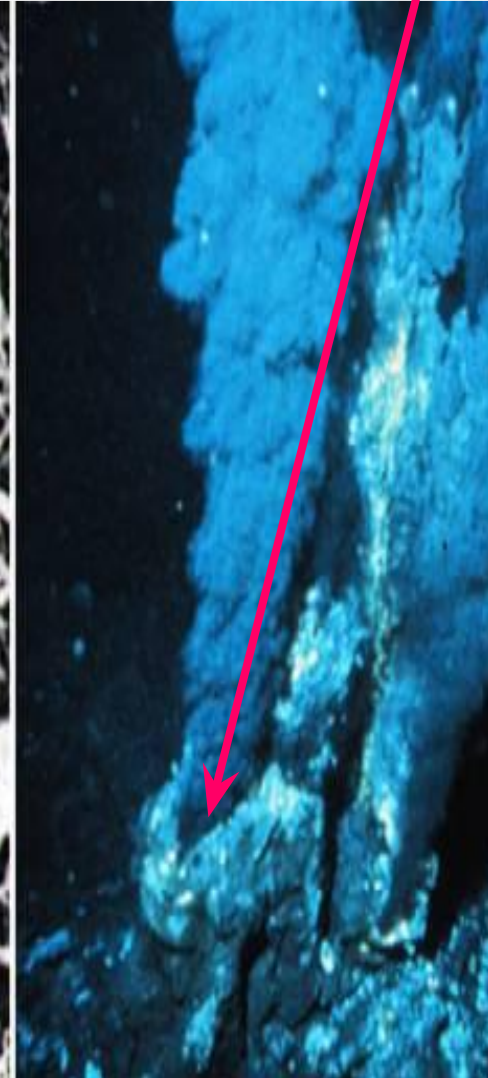
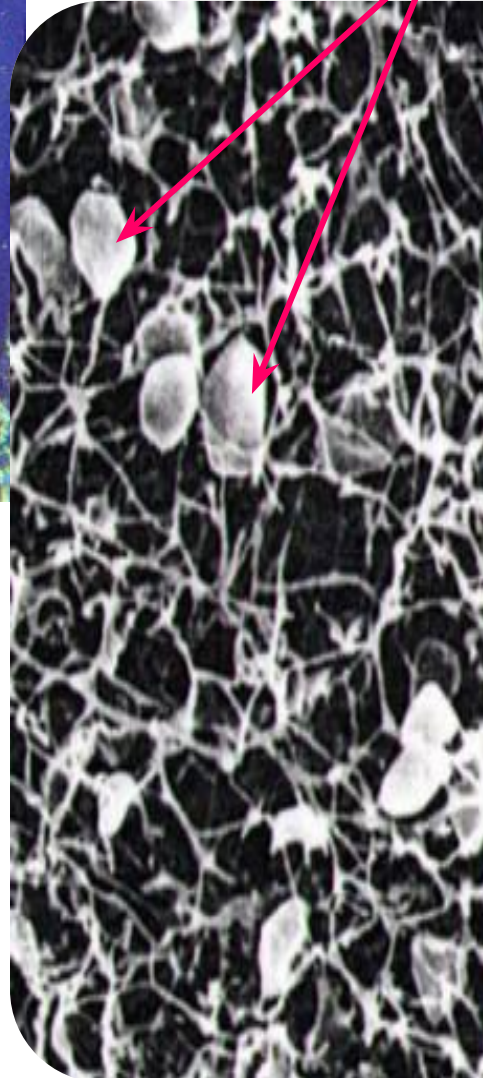


Чёрный курильщик



Жерло «Черных курильщиков»

Бактерии около
«Курильщиков»



Бактерии способны расти при температуре воды $250 - 300^{\circ}\text{C}$ и давлении 265 атм (при этом давлении вода в жидком состоянии может находиться до 460°). Эти бактерии выделены из проб воды, поднятых с глубины 2560 м над поверхностью Тихого океана.