УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

Микроскопические и культуральные методы диагностики инфекционных заболеваний

Цель микробиологических исследований — установить факт наличия или отсутствия возбудителя в организме больного или на объектах окружающей среды.

Исследуемый материал – субстрат, в котором предполагается наличие возбудителя.

Исследуемый материал

- Образцы материала для микробиологического исследования следует забирать до назначения антимикробной терапии, с соблюдением правил асептики для предупреждения загрязнения материала.
- Каждый образец следует рассматривать как потенциально опасный. При заборе, транспортировке, хранении и работе с ним необходимо соблюдать правила биологической безопасности.
- Выбор материала для микробиологического исследования должен соответствовать характеру инфекционного процесса. Так, например, при установлении этиологии пневмонии материалом должна быть мокрота, а при раневых инфекциях отделяемое следует забирать из глубины раны.

Принципы лабораторной диагностики

Наличие возбудителя можно подтвердить обнаружением:

- **его клеток или частиц (микроскопия);**
- **живого возбудителя;**
- **его антигенов;**
- **его нуклеиновой кислоты.**

Принципы лабораторной диагностики

Определение наличия иммунологических реакций организма пациента на антигены возбудителя:

- **выявление антител к антигенам возбудителя в сыворотке крови пациента,**
- **выявление у пациента реакций гиперчувствительности на антигены возбудителя.**

Методы лабораторной диагностики инфекционных заболеваний

- микроскопический
- культуральный
- биологический
- серологический
- аллергологический
- молекулярно-генетический

Микроскопический метод

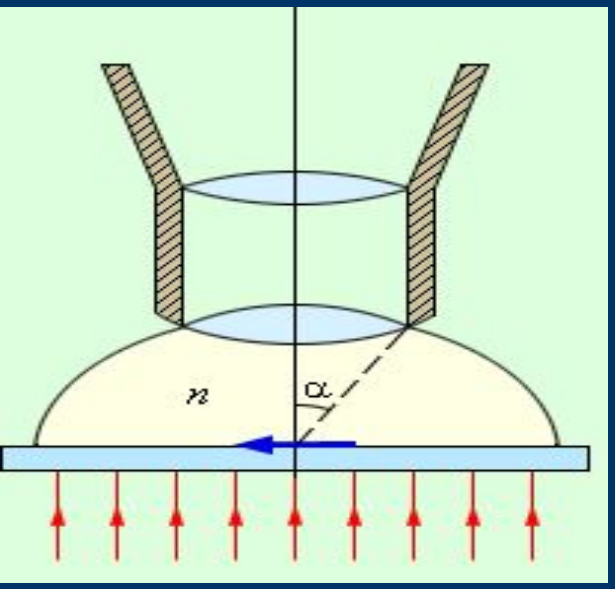
Микроскопические методы исследований включают приготовление мазков и препаратов для микроскопирования.

Он направлен на обнаружение в исследуемом материале - возбудителей инфекций и изучение их **морфологических** и **тинкториальных** свойств.

Морфологические свойства характеризуются формой и размером клеток, а тинкториальные свойства – отношением микроорганизмов к красителям.

Результаты микроскопических исследований носят **ориентировочный** характер (например, определяют отношение возбудителей к окраске), так как многие микроорганизмы лишены данных особенностей.

Световая микроскопия



Световая микроскопия с иммерсионной системой;

Увеличение – 900 раз

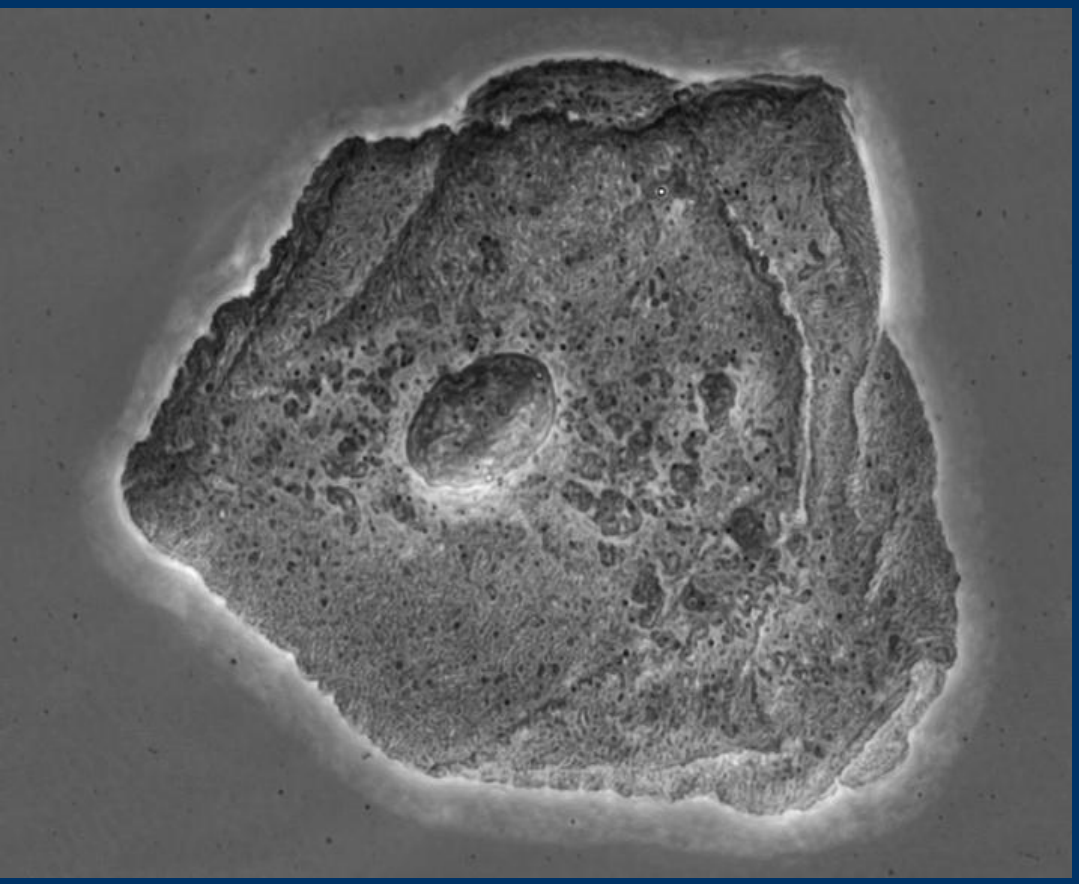
Разрешающая способность – 0,2 мкм

Световая микроскопия

Темнопольная микроскопия – источник света располагается сбоку. При таком освещении неоднородности, имеющиеся в образце, рассеивают падающий свет и в микроскопе изображение образца наблюдают в рассеянном свете, а освещающий свет «напрямую» не попадает в объектив

Treponema pallidum

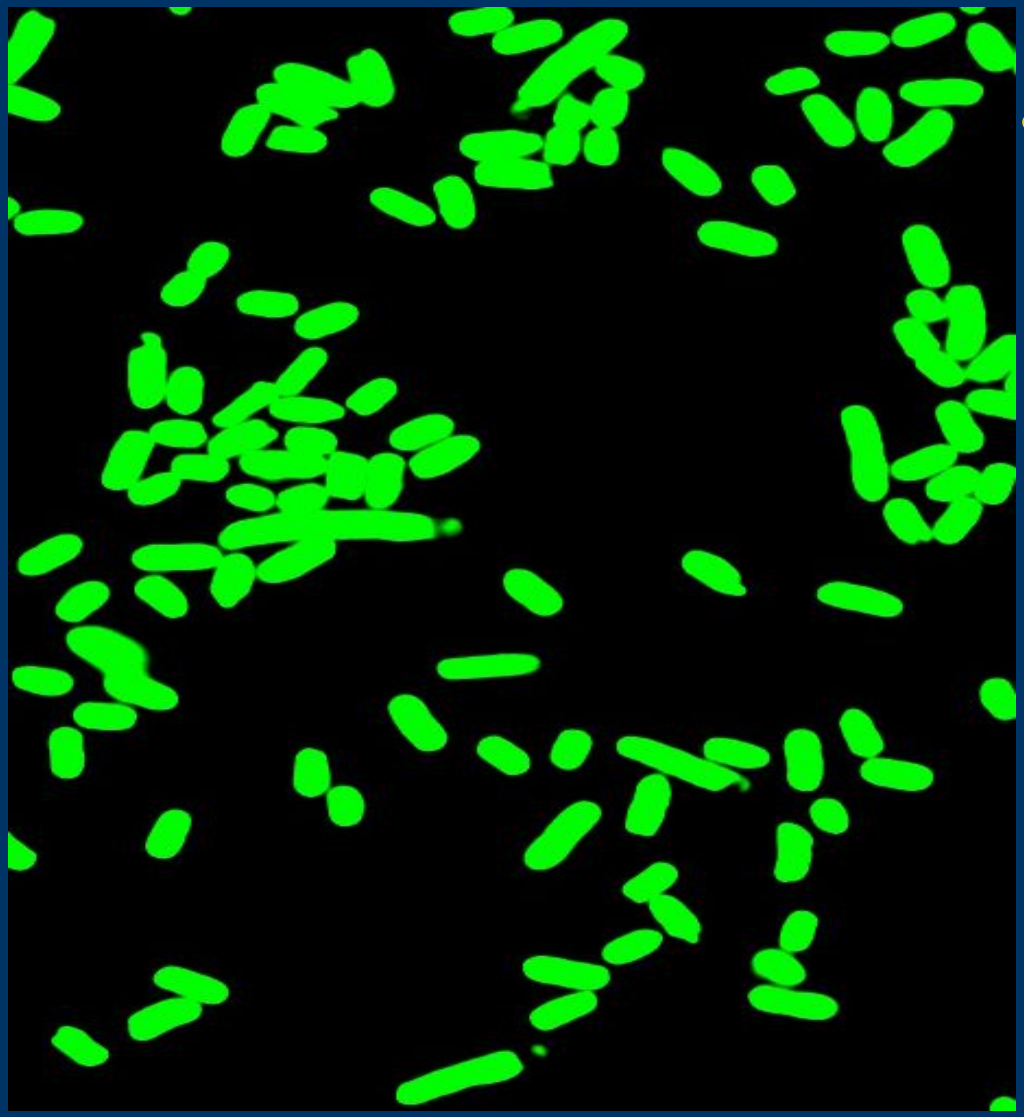
Световая микроскопия



Фазово-контрастная микроскопия

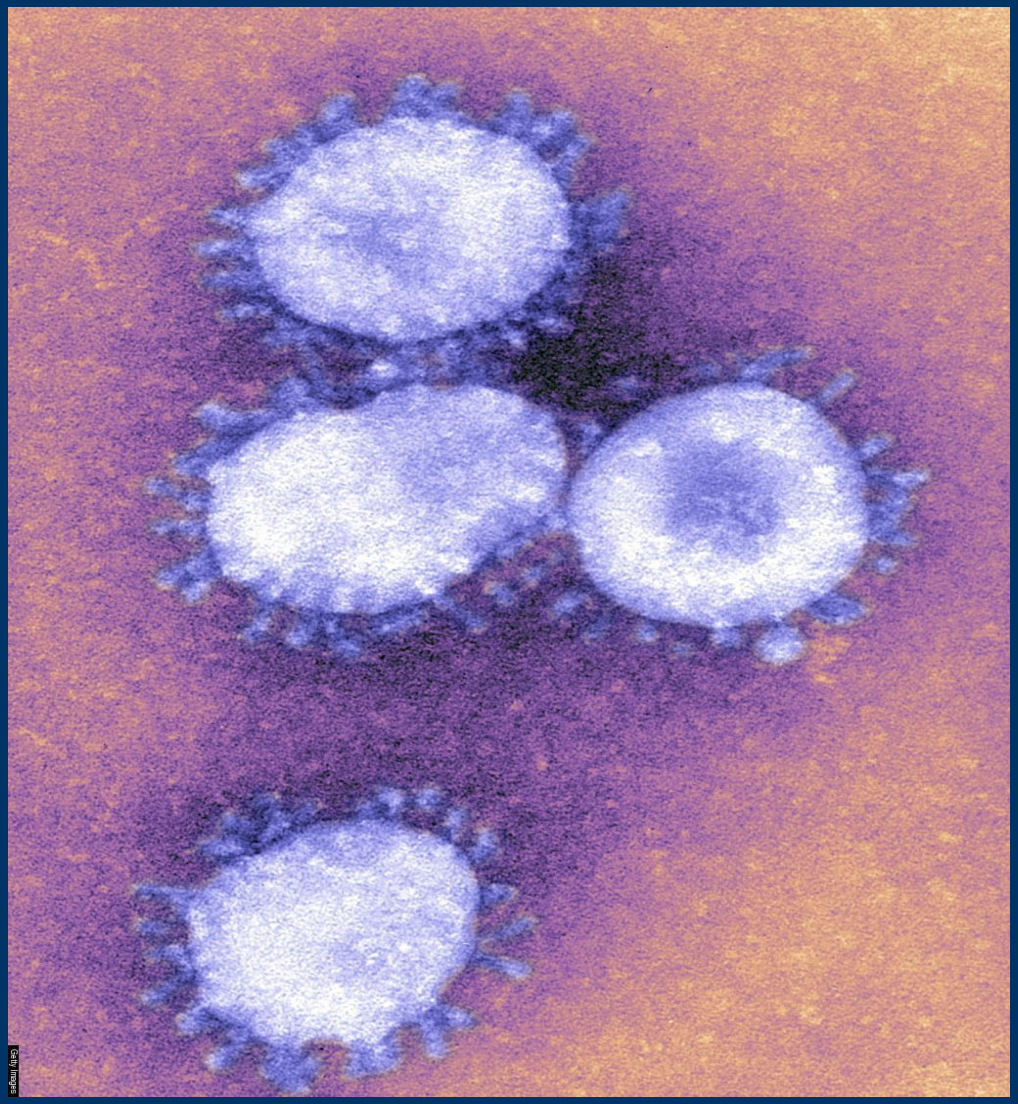
применяется для исследования изображений прозрачных объектов, особенно живых клеток. При помощи специальных устройств часть света, проходящего через микроскоп, сдвигается по фазе на половину длины волны относительно другой части, благодаря чему достигается контрастное изображение.

Световая микроскопия



Люминесцентная микроскопия – основана на способности некоторых красителей светиться в ультрафиолетовых лучах. Используется ультрафиолетовый излучатель.

Электронная микроскопия



Увеличение – 10^6 раз

Разрешающая способность – 0,1 нм

(1 нм – 10^{-9} м)

Электронная микроскопия

В электронном микроскопе освещение исследуемых объектов проводится не световыми лучами, а потоком электронов.

Источником электронов в электронном микроскопе является электронная пушка (вольфрамовая нить, нагреваемая электрическим током).

В качестве линз в электронном микроскопе используются электромагниты.

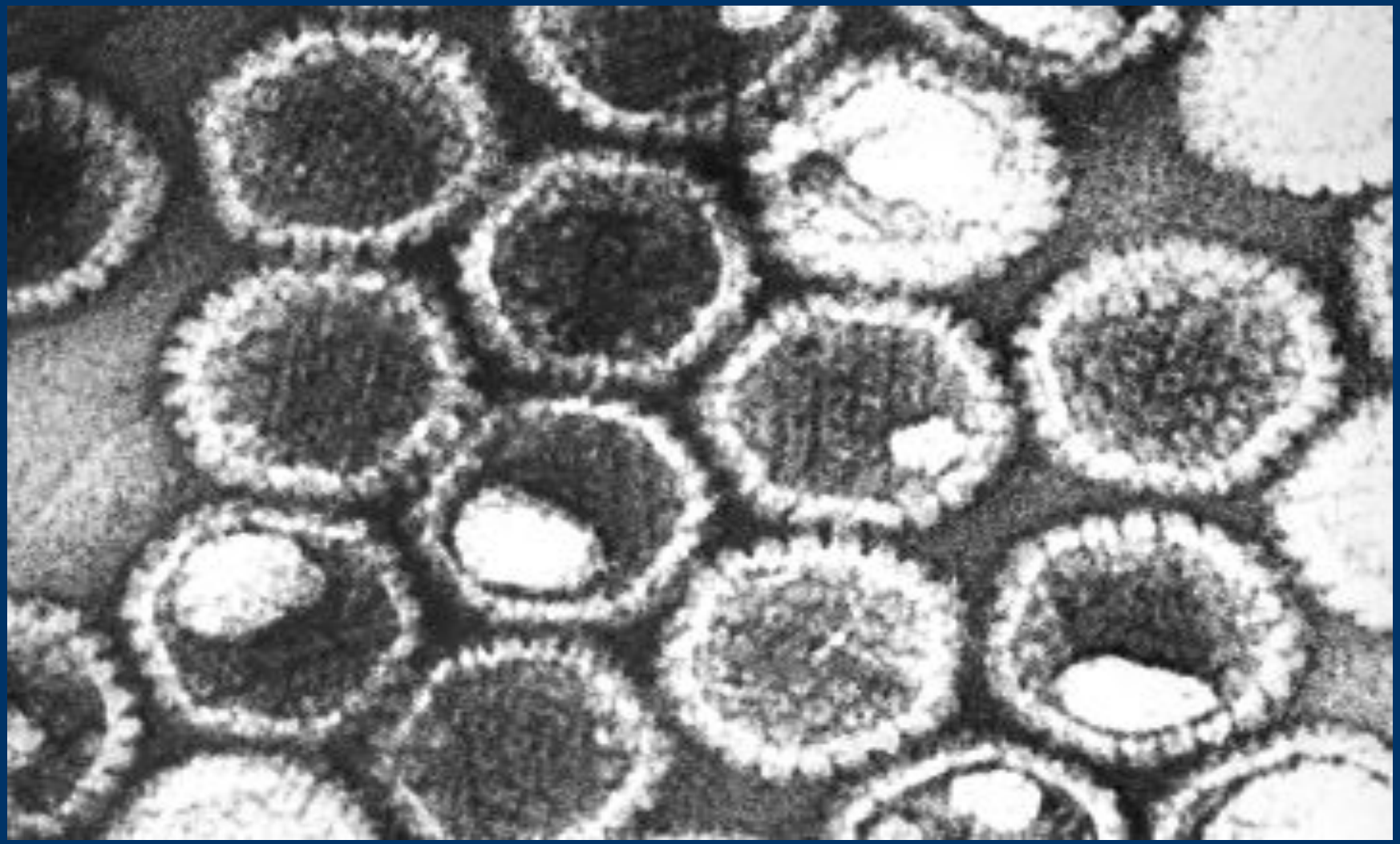
Выходящий из электронной пушки пучок электронов движется в вакууме под влиянием электромагнитного поля. Конденсорная линза направляет пучок электронов на объект, а увеличивающие линзы создают увеличенное изображение, выводящееся на экран.

Электронная микроскопия

Выделяют два основных вида электронных микроскопов: просвечивающие и сканирующие.

В просвечивающем электронном микроскопе электронный пучок проходит через ультратонкий образец так, что часть электронов рассеивается на образце, а часть – нет. Затем через систему магнитных (увеличивающих) линз на люминесцентном экране создается плоскостное изображение о структуре образца.

Электронная микроскопия



Herpes simplex virus 1

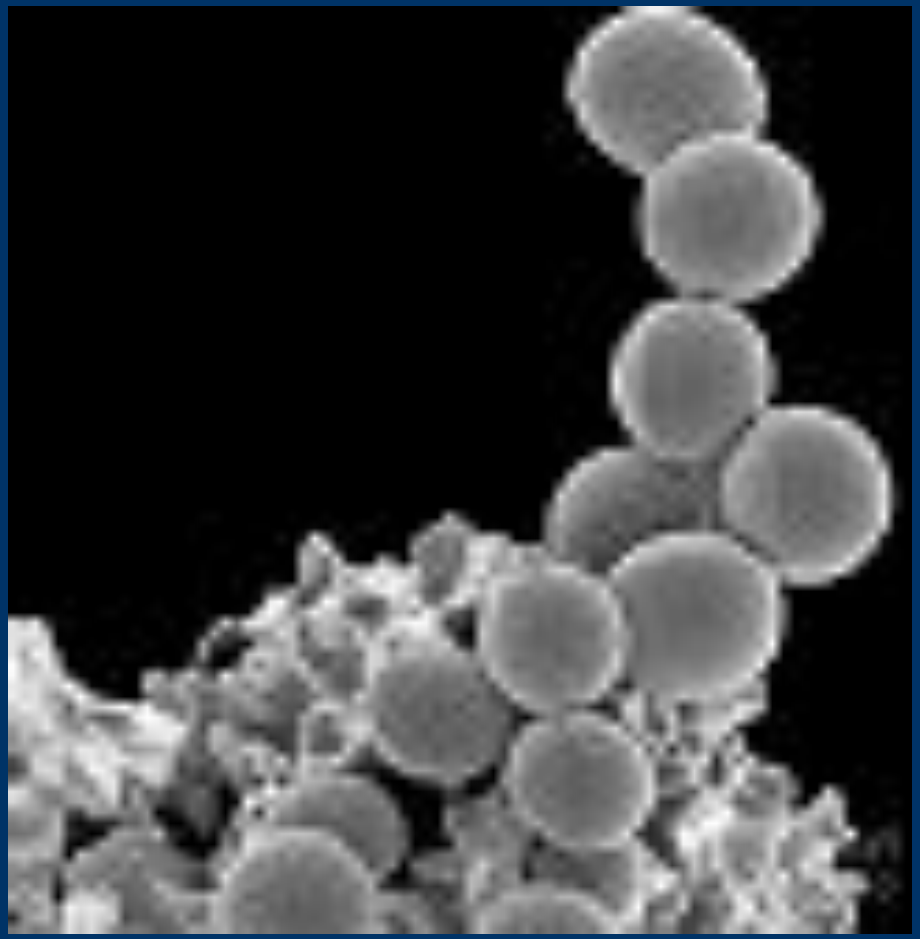
Электронная микроскопия

Устройство **сканирующего электронного микроскопа** основано на принципе прохождения пучка электронов по поверхности образца.

В сканирующем электронном микроскопе пучок электронов собирается в тонкий луч, которым сканируют образец.

Отраженные от поверхности образца электроны собираются и формируют на экране объемное изображение.

Электронная микроскопия



Основные методики окраски микроорганизмов

Методы окраски

- **Простые – применяется один краситель (метиленовый синий, фуксин).**
- **Сложные – применение нескольких красителей (метод Грама, метод Циль-Нильсена, по Ожешко, по Бурри – Гинсу, по Нейссеру).**

метод Грама

В 1884 году датский бактериолог Ганс Кристиан Грам предложил метод окраски бактерий

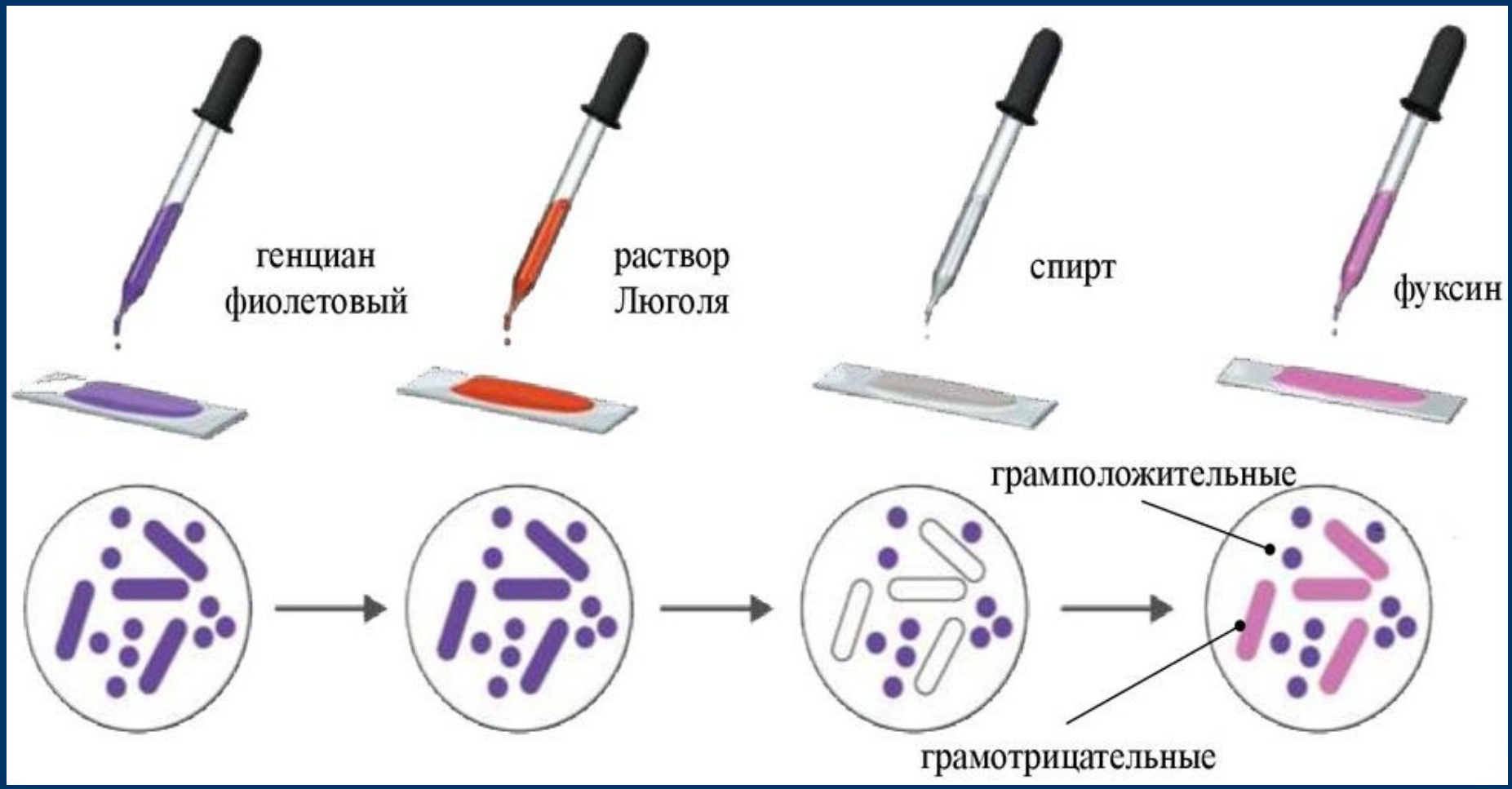
- **После окраски по Граму бактерии, имеющие толстую клеточную стенку окрашиваются в фиолетовый цвет – их называют**

Грам-положительными (Грам+)

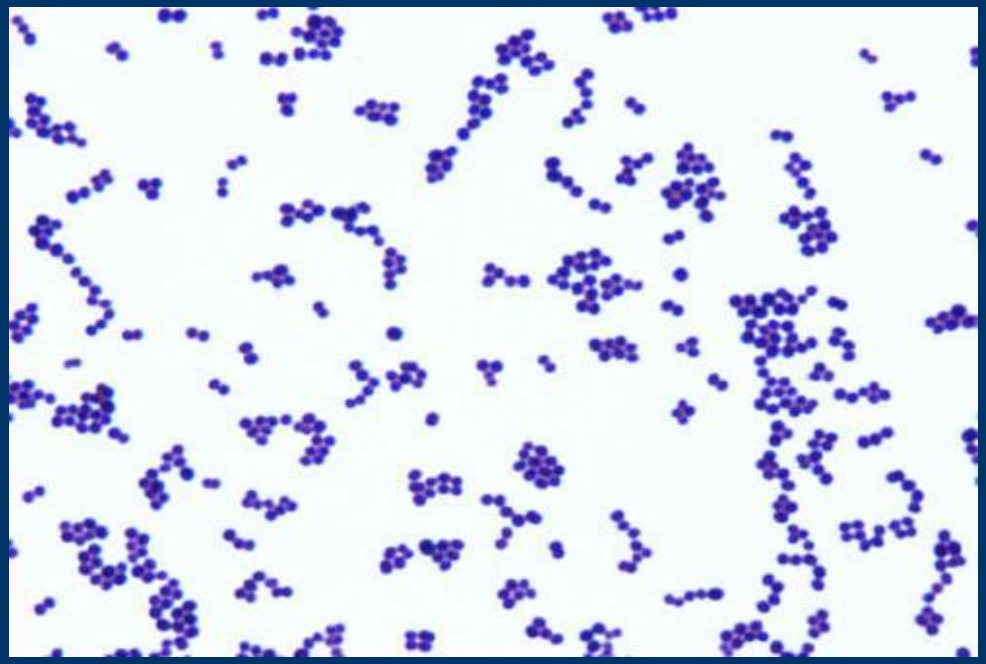
- **Бактерии, имеющие тонкую клеточную стенку окрашиваются в красный цвет – их называют**

Грам-отрицательными (Грам -)

Окраска по Граму



Грам +



Staphylococcus

Грам -

Escherichia

Грамположительные бактерии:

- **кокки (за исключением р. *Neisseria*, р.*Veillonella*)**
- **спорообразующие палочки (р. *Bacillus*, р. *Clostridium*)**
- **р. *Corynebacterium*, р. *Mycobacterium*, р. *Listeria***

Грамотрицательные бактерии:

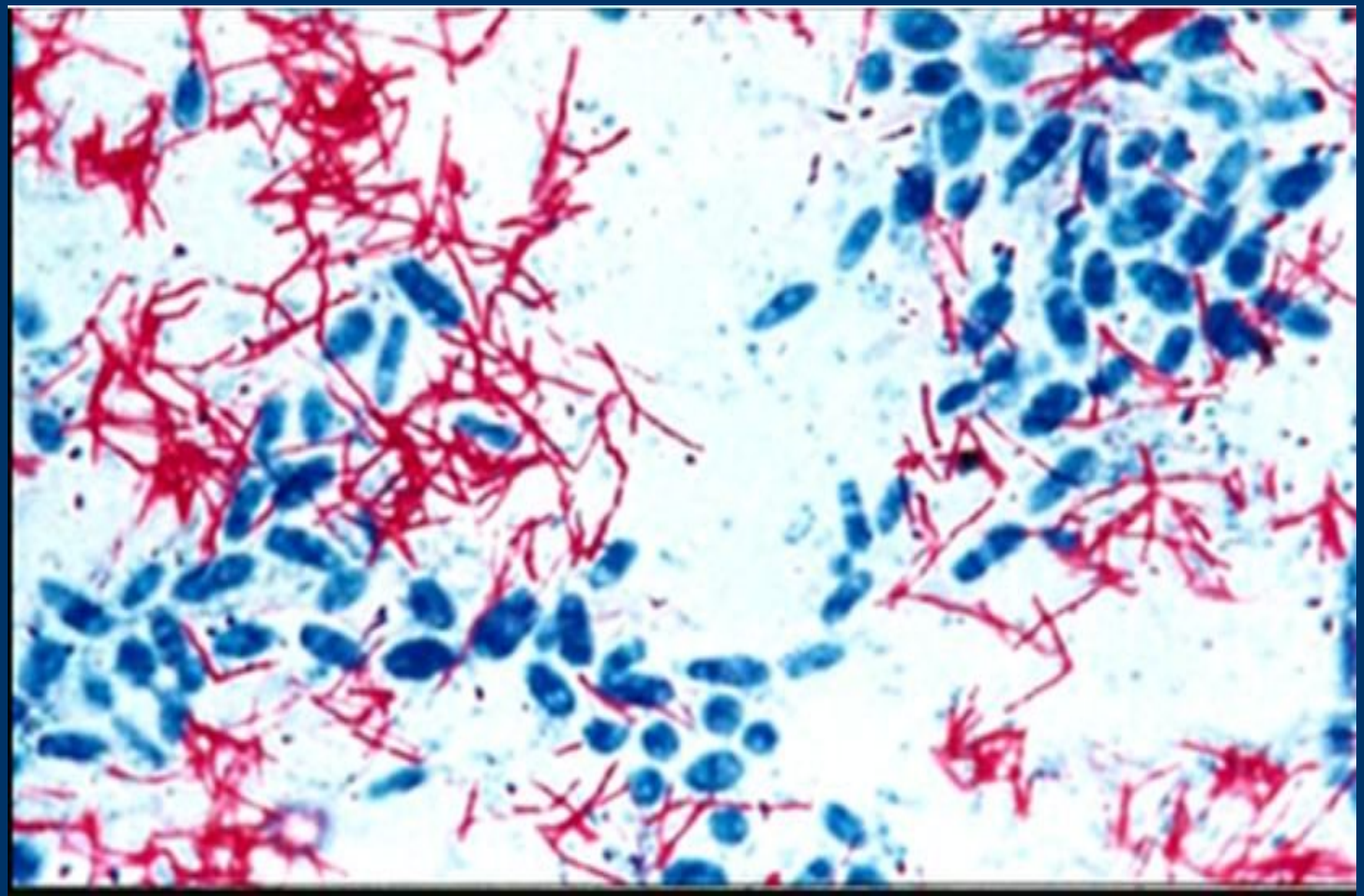
- **кокки - р. *Neisseria*, р. *Veillonella***
- **палочковидные бактерии не образующие спор**
- **извитые формы (вибрионы, спириллы, спирохеты).**

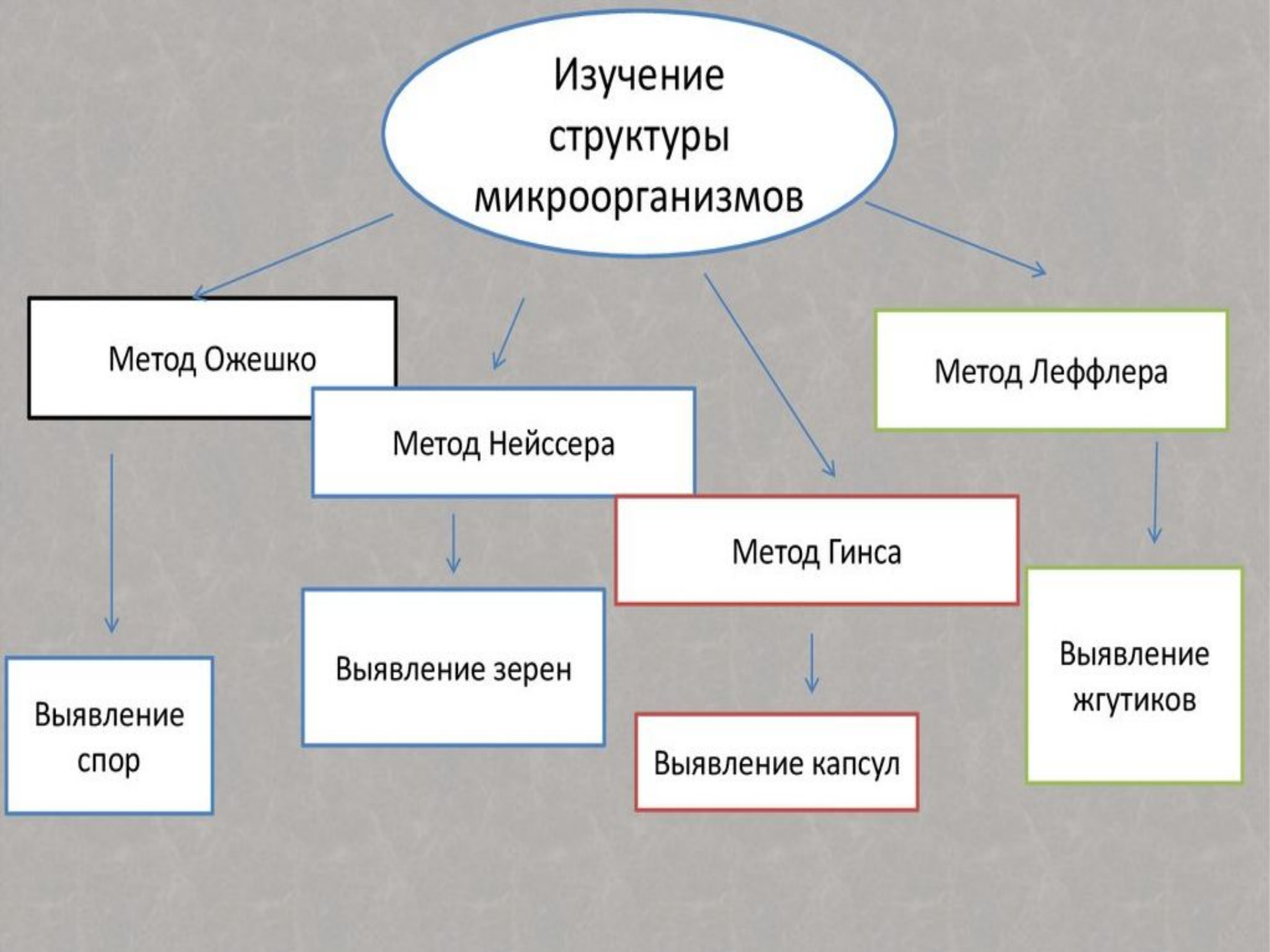
метод Циля – Нильсена

1. На фиксированный мазок накладывают белую фильтровальную бумагу и наливают карболовый фуксин Циля. Препарат 2-3 раза подогревают в в пламени до появления паров.
2. Препарат промывают водой, бумагу сбрасывают.
3. Препарат обесцвечивают в 5% растворе серной кислоты.
4. Промывают водой.
5. Докрашивают синькой Леффлера 3-5 минут.
6. Промывают водой, высушивают, микроскопируют.

Кислотоустойчивые бактерии и споры - красного цвета, а остальная микрофлора — синего цвета.

метод Циля – Нильсена

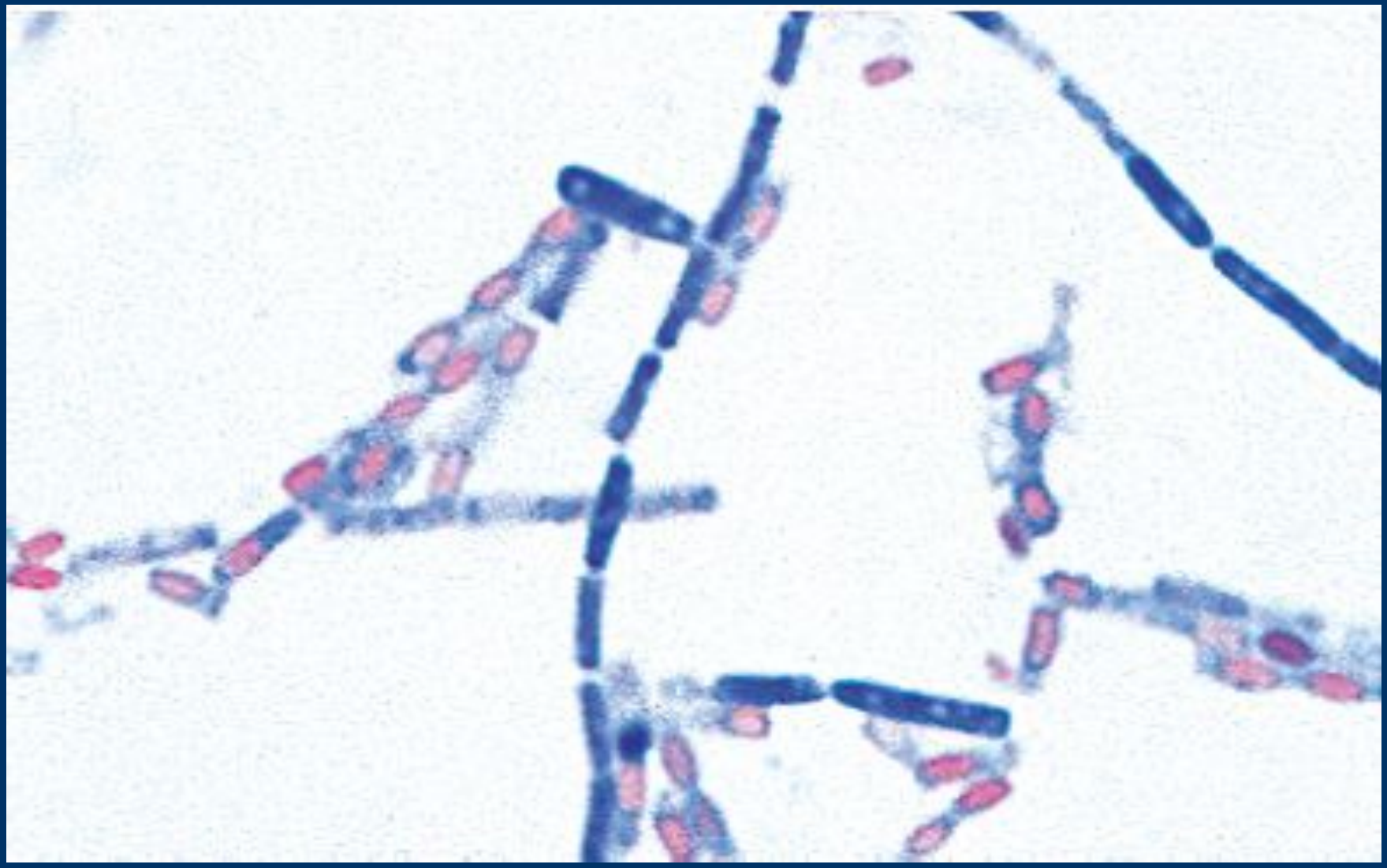



Изучение структуры микроорганизмов
Метод Ожешко
Метод Нейссера
Метод Гинса
Метод Леффлера
Выявление спор
Выявление зерен
Выявление капсул
Выявление жгутиков

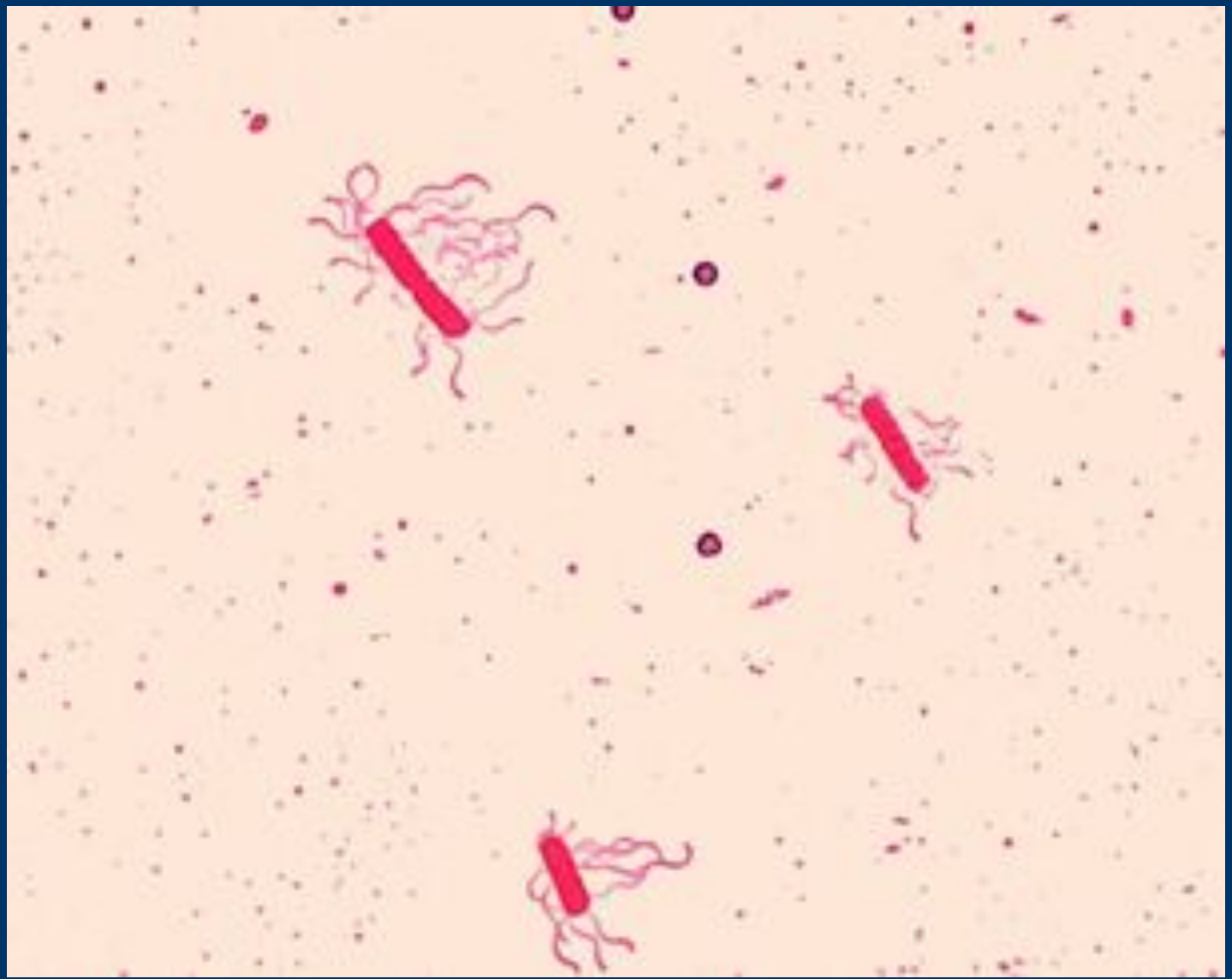
Окраска по Бурри-Гинсу

Окраска по Нейссеру

Окраска по Ожешки (A.Aujeszky)



Окраска по Леффлеру

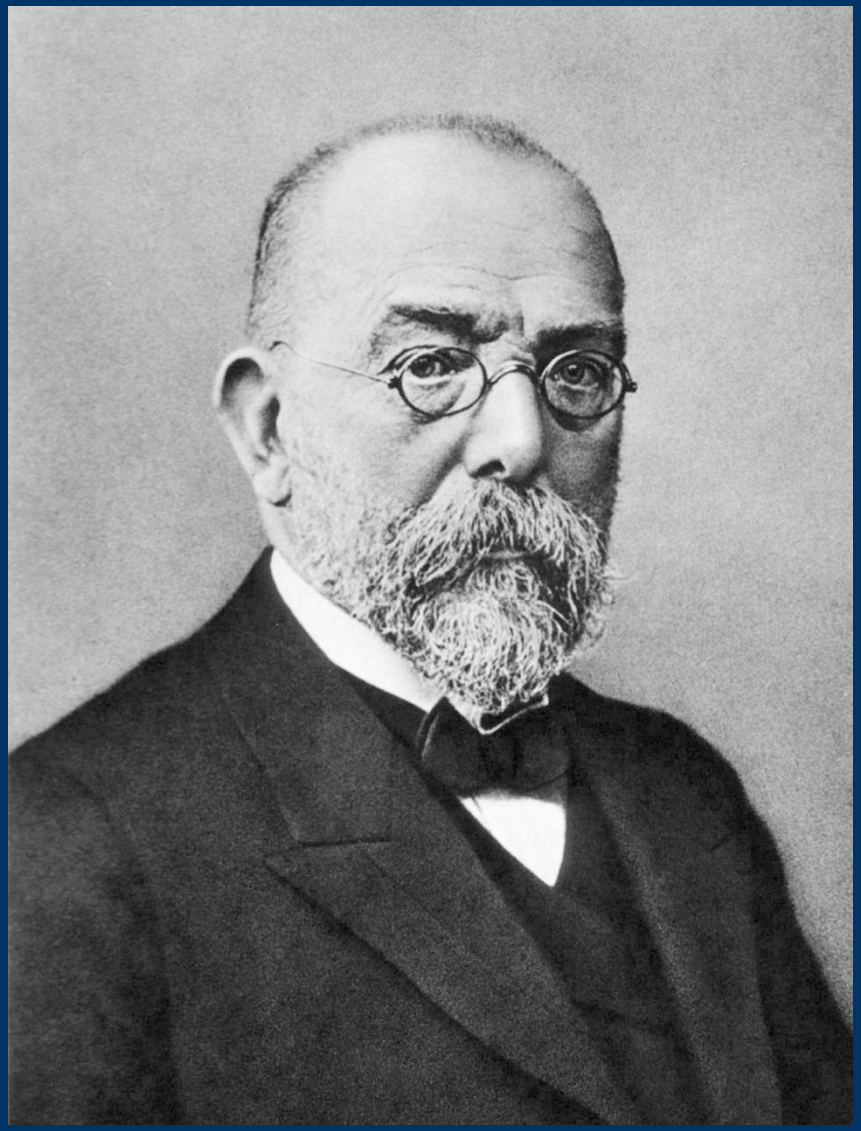


Микробиологические методы исследований (культуральные)

- **Микробиологические методы исследований** — «золотой стандарт» микробиологической диагностики, так как результаты микробиологических исследований позволяют точно установить факт наличия возбудителя в исследуемом материале.
- Идентификацию чистых культур (до вида микроорганизма) проводят с учётом морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических, токситенных и антигенных свойств микроорганизма.
- Большинство исследований включает определение чувствительности к антимикробным препаратам у выделенного возбудителя.

Характеристика питательных сред

Роберт Кох (1843-1910)



Немецкий бактериолог, один из основоположников современной микробиологии, лауреат Нобелевской премии (1905).

Создал многие важнейшие методы исследования: ввёл в практику анилиновые красители, предложил использовать в микроскопии иммерсионные системы, разработал метод культивирования микроорганизмов на жидких и плотных питательных средах.

Питательные среды

По консистенции питательные среды делят на:

- **жидкие**
- **плотные (1,5- 3% агара)**
- **полужидкие (0,3- 0,7 % агара)**

Агар - полисахарид сложного состава из морских водорослей

Питательные среды

По назначению среды делят на:

- **универсальные (простые), используемые для большинства микроорганизмов (мясо - пептонный бульон - МПБ, мясо - пептонный агар - МПА)**
- **специальные - среды для микроорганизмов, не растущих на универсальных средах (среда Левенштейна- Иенсена для возбудителя туберкулеза)**

среда Левенштейна- Иенсена

Питательные среды

- **дифференциально- диагностические - для дифференциации микроорганизмов по ферментативной активности и культуральным свойствам (среды Эндо, Плоскирева, Левина, Гисса)**
- **селективные (элективные) - для выделения определенных видов микроорганизмов и подавления роста сопутствующих - пептонная вода, селенитовая среда, среда Мюллера**

дифференциально-диагностические среды

среда Эндо

среды Гисса

Питательные среды

По происхождению среды делят на:

- **естественные**
- **полусинтетические**
- **синтетические**

Бактериологический метод – это метод, позволяющий определить вид микроорганизма по его биологическим и культуральным свойствам.

Бактериологический метод исследования включает 4 этапа

Бактериологический метод исследования

1 этап: посев исследуемого материала на плотные и жидкие питательные среды с целью получения изолированных колоний.

Посевы помещают в термостат при t =37 ^{0}C.

Колония - это популяция микробных клеток одного вида, сформировавшаяся в результате деления одной микробной клетки в условиях культивирования на плотной питательной среде.

Методы получения изолированных колоний бактерий

Метод Л. Пастера (Louis Pasteur; 1822 – 1895) — французский микробиолог

Метод разбавлений.

Из исследуемого материала, содержащего микроорганизмы, делается ряд последовательных разведений в стерильной среде (физиологический раствор, питательный бульон).

С каждым разведением количество микробных клеток будет уменьшаться и можно получить такие разведения, в которых будет находиться только одна микробная клетка в 1 мл.

Материал высевают на плотную питательную среду.

Методы получения изолированных колоний бактерий

Метод Коха (Robert Koch; 1843 — 1910) — немецкий микробиолог.

- **Исследуемый материал вносят бактериологической петлёй в пробирку с расплавленным и охлаждённым до 45^0С МПА, равномерно размешивают.**
- **Каплю из этого разведения переносят во вторую пробирку, из второй в третью и т.д.**
- **Содержимое каждой пробирки выливают в стерильные чашки Петри, оставляют для застывания среды, а затем помещают в термостат вверх дном во избежание осаждения конденсата.**
- **При посеве микроорганизмов на плотную среду они размножаются только на том месте, куда попали первоначально. Из каждой жизнеспособной клетки образуется видимое невооружённым глазом скопление – колония.**

Методы получения изолированных колоний бактерий

Метод Дригальского (K.W. Drigalski, 1871—1950) - нем. бактериолог

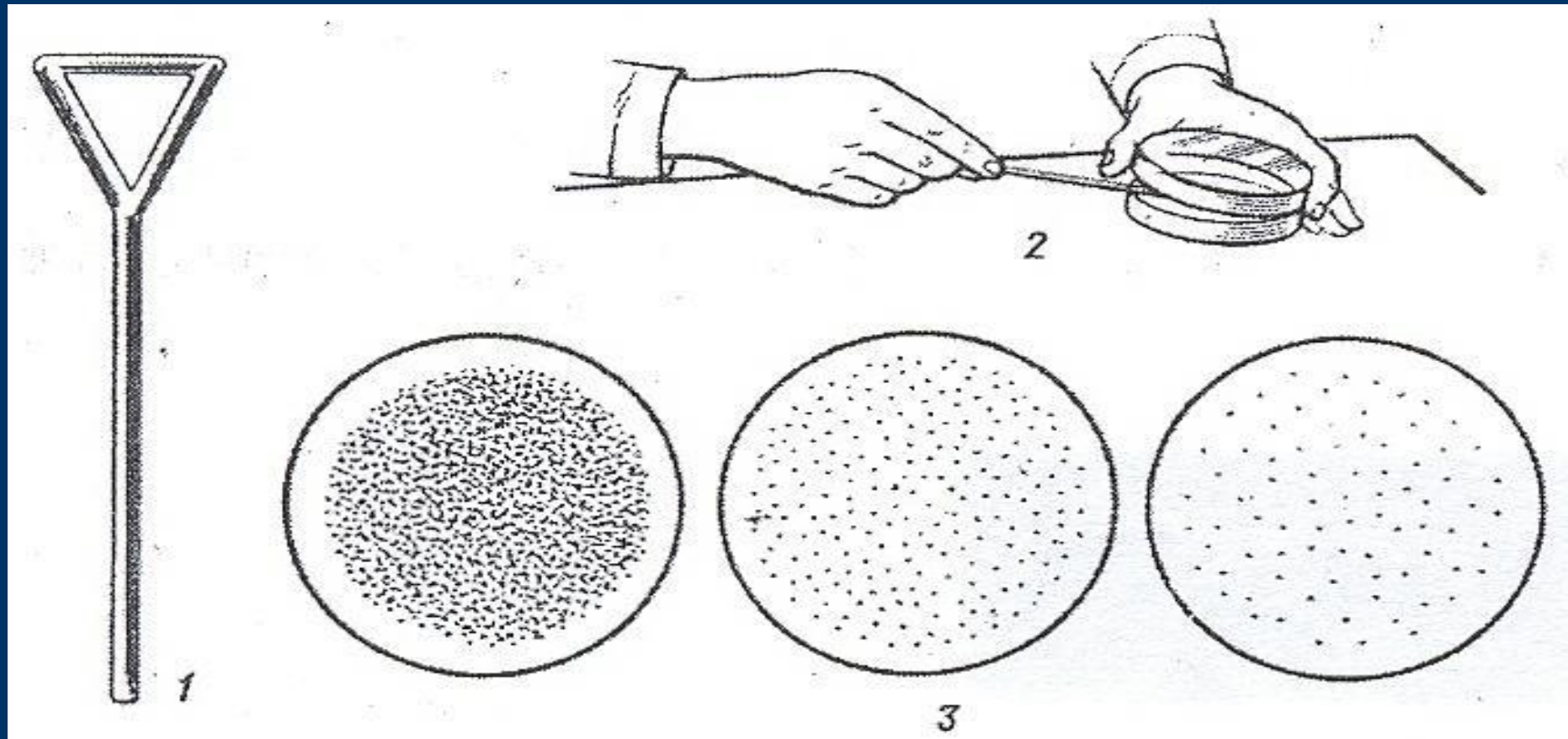
- **Основан на механическом разделении микробных клеток на поверхности плотной питательной среды.**
- **Для посева по этому методу используют чашки Петри, залитых плотной питательной средой. На поверхность застывшей среды в первую чашку вносят каплю исследуемого материала, содержащего микроорганизмы.**
- **Затем с помощью шпателя каплю растирают по всей поверхности среды. Этим же шпателем проводят по поверхности среды во второй и третьей чашках, в результате чего микробные клетки разделяются.**
- **После инкубации в первой чашке наблюдается рост в виде сплошного налёта. В следующих чашках количество становится меньше, и встречаются отдельно расположенные колонии.**

Методы получения изолированных колоний бактерий

Метод Дригальского (шпатель)

Методы получения изолированных колоний бактерий

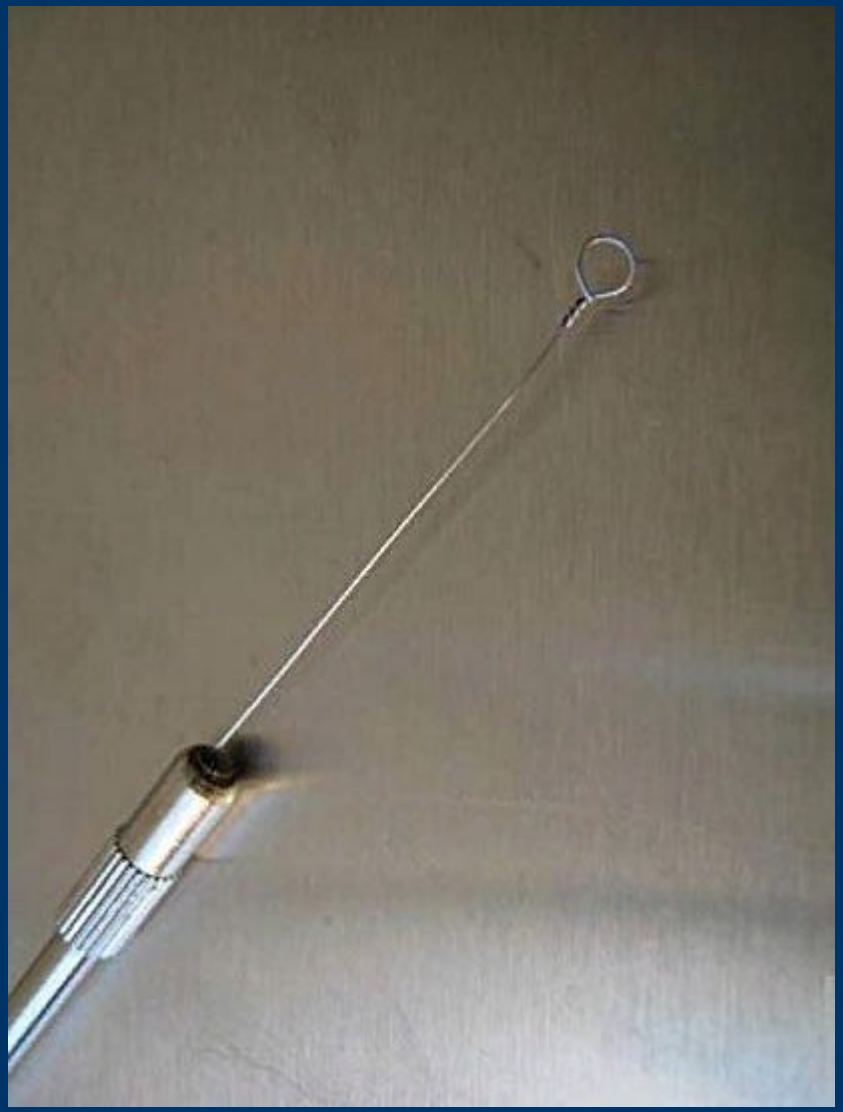
Метод Дригальского



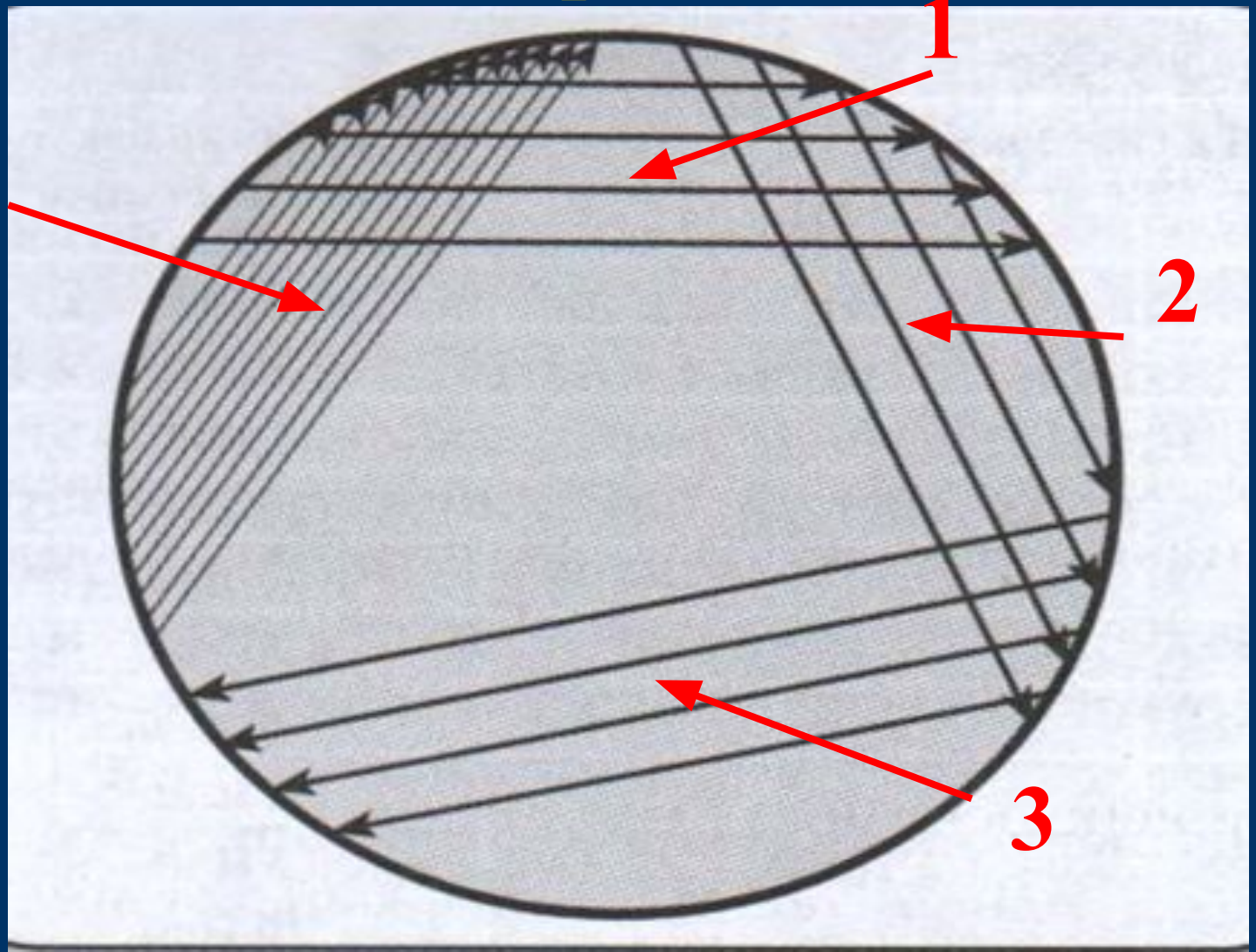
метод посева по Gould (метод секторных посевов)

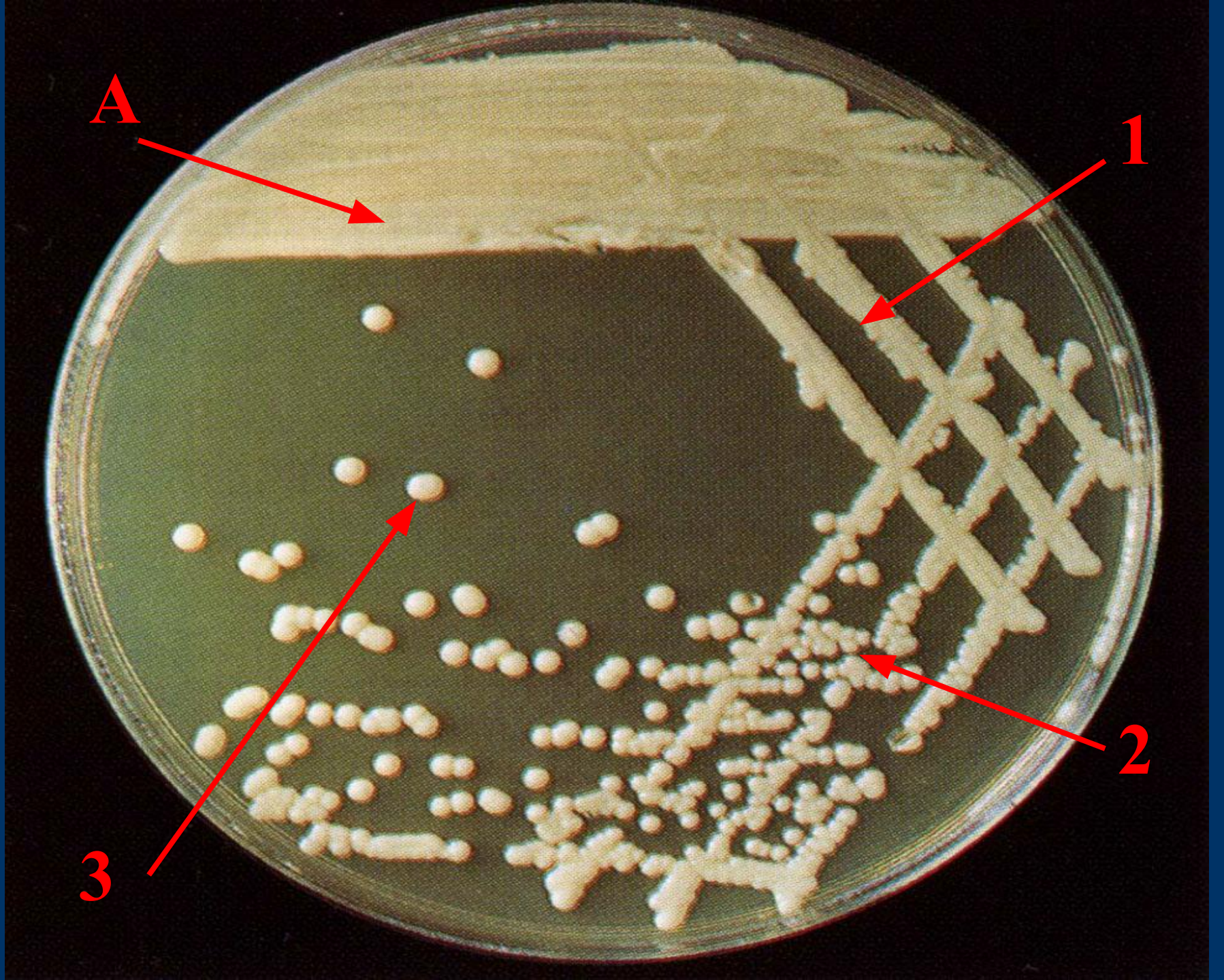
- Материал помещают в сектор А чашки Петри, где осторожно распределяют, сделав несколько движений петлей по поверхности агара.
- Петлю стерилизуют обжиганием и проводят ею 4 раза по поверхности агара через сектор А в сектор 1.
- Петлю вновь обжигают и проводят 4 полосы через 1-й сектор во 2-й, затем аналогичным образом стерильной петлей из 2-го сектора в 3-й чашки Петри.

Микробиологическая петля



метод посева по Gould (метод секторных посевов)




A
1
2
3

Бактериологический метод исследования

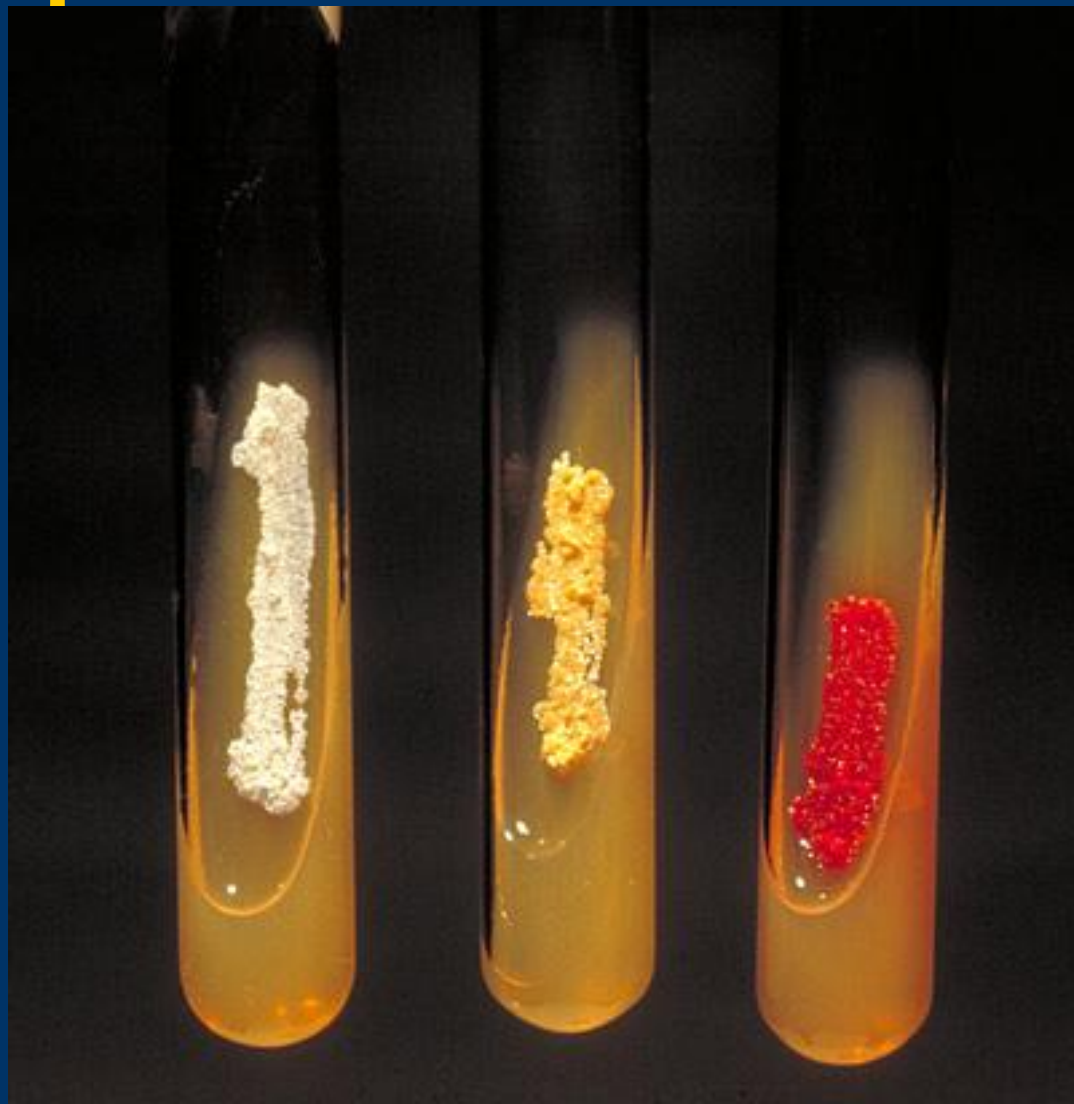
2 этап: изучают характер роста микроорганизмов на жидких и плотных питательных средах, из изученных колоний готовят мазок (окрашивают по Граму, микроскопируют). Материал изолированных колоний пересевают на плотные питательные среды с целью получения чистой культуры микроорганизмов.

Посевы помещают в термостат при t =37 ^{0}C.

Чистая культура - масса микроорганизмов, принадлежащих одному виду.

Чистую культуру получают путем пересева на стерильную питательную среду клеток, взятых из изолированных колонии бактерий.

Получение чистой культуры микроорганизмов



Бактериологический метод исследования

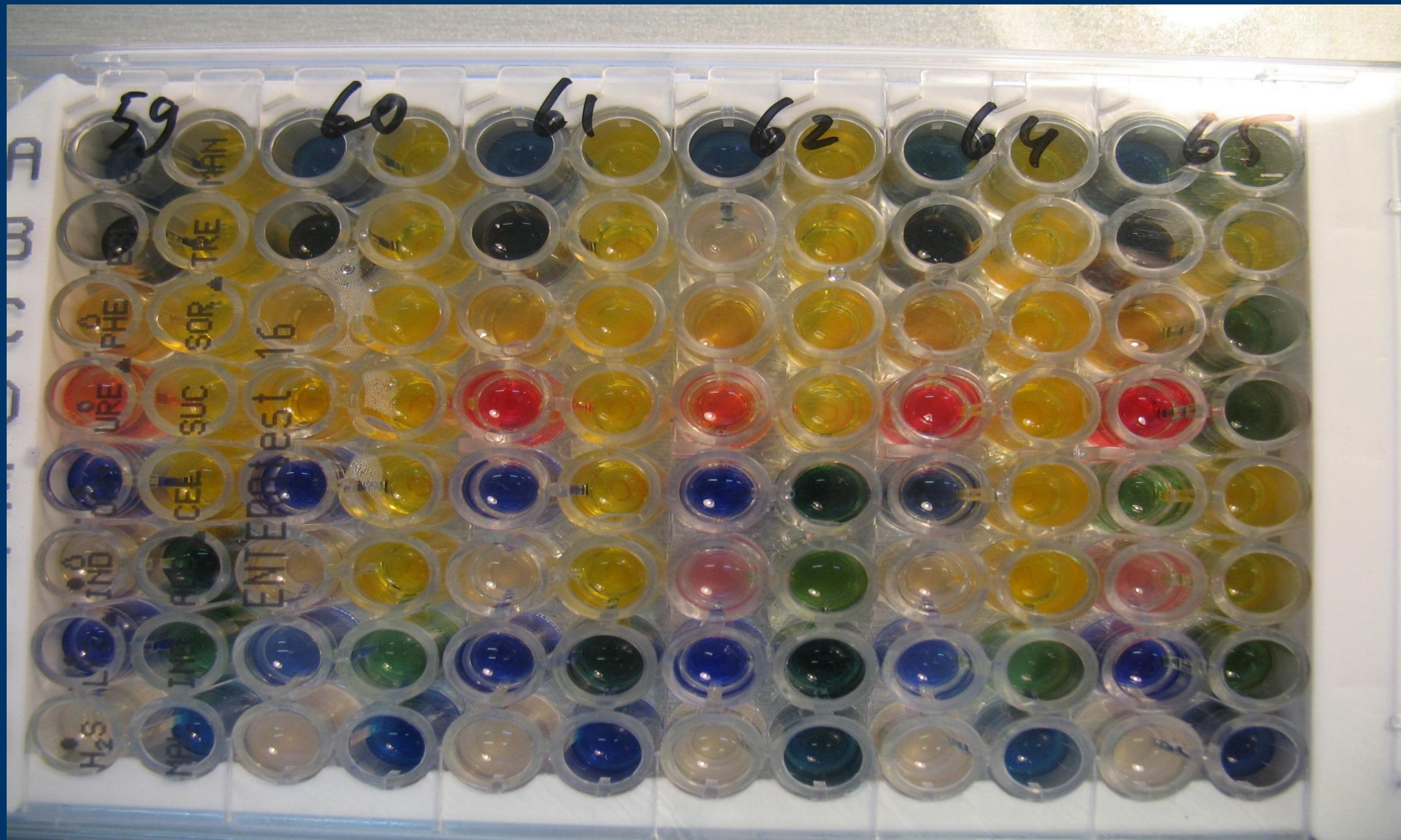
3 этап: Определяют чистоту выделенной культуры микроорганизмов (из полученных посевов делают мазок, окрашивают по Граму, микроскопируют).

С выделенной чистой культурой ставят реакции «пёстрого ряда» для определения биохимической активности микроорганизмов, серологические реакции, определяют чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

Посевы помещают в термостат при t =37 ^{0}C.

Биохимическая активность

Биохимическая активность



Антигенное строение

- **Антигенную структуру выделенного штамма *E.coli* характеризуют формулой, в которую входят буквенно-цифровые обозначения О-антигена, К-антигена и Н-антигена**
- ***E. coli* О111:К58:Н2**

Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Метод индикаторных дисков

Бактериологический метод исследования

4 этап: учитывают результат реакции «пёстрого ряда», серологических реакций, чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Выдают заключение.

Серологические реакции

Серологический метод

Серологическими реакциями называются реакции антиген-антитело, происходящие *in vitro* (в пробирке).

С помощью серологических реакций изучается антигенная структура возбудителя или определяются антитела, образующиеся в организме человека или лабораторных животных в ответ на внедрение антигена (возбудителя).

Серологические реакции используют в двух целях:

- **для серотипирования микроорганизмов, их токсинов, антигена вообще с помощью известного антитела (*иммунной диагностической сыворотки*)**
- **для серодиагностики - определения титра антител в сыворотке крови больного при бактериальных или вирусных заболеваниях с помощью известного антигена (*диагностикума*).**

- **Иммунные диагностические сыворотки** - препараты, содержащие известные антитела для определения родовой, видовой и типовой принадлежности антигена.
  Их получают путем многократной **иммунизации** (гипериммунизации) лабораторных животных соответствующими антигенами
- **Диагностикумы** - препараты, содержащие известный антиген в виде взвеси живых или убитых бактерий, продуктов их расщепления, токсины, вирусы.

Серологические реакции подразделяются на прямые и непрямые.

В прямых серологических реакциях результат взаимодействия антигенов с антителами наблюдается непосредственно по изменению оптических свойств раствора (образование хлопьев, помутнение, опалесценция).

К прямым серологическим реакциям относятся реакции агглютинации и преципитации.

В непрямых серологических реакциях для визуализации результата взаимодействия антигенов и антител используются индикаторные системы (эритроциты, частицы латекса, лабораторные животные).

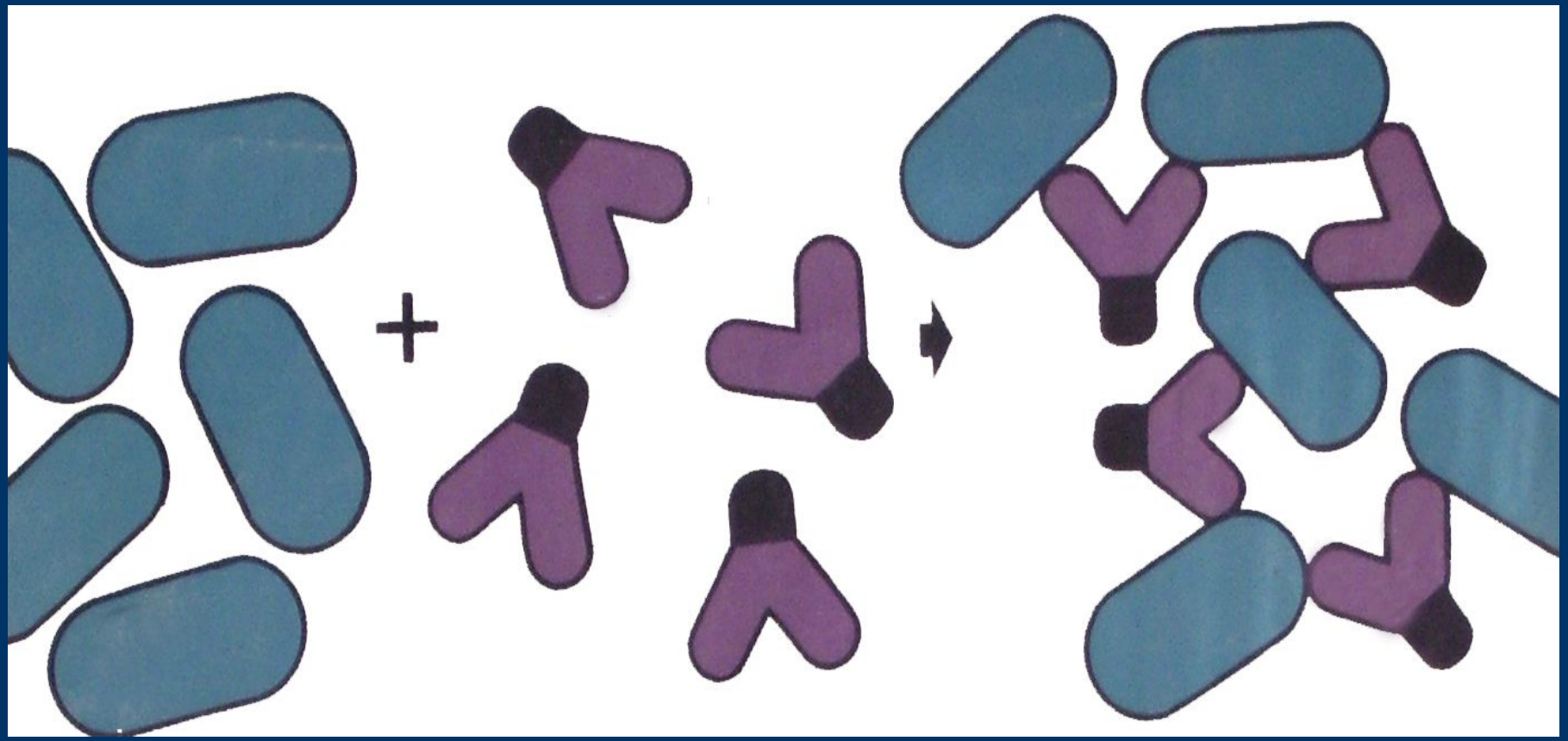
К непрямым серологическим реакциям относятся реакция связывания комплемента, реакция непрямой гемагглютинации, реакция латекс-агглютинации, иммуноферментный анализ, реакция нейтрализации токсина антитоксической сывороткой и др.

Прямые серологические реакции

Реакция агглютинации (РА)

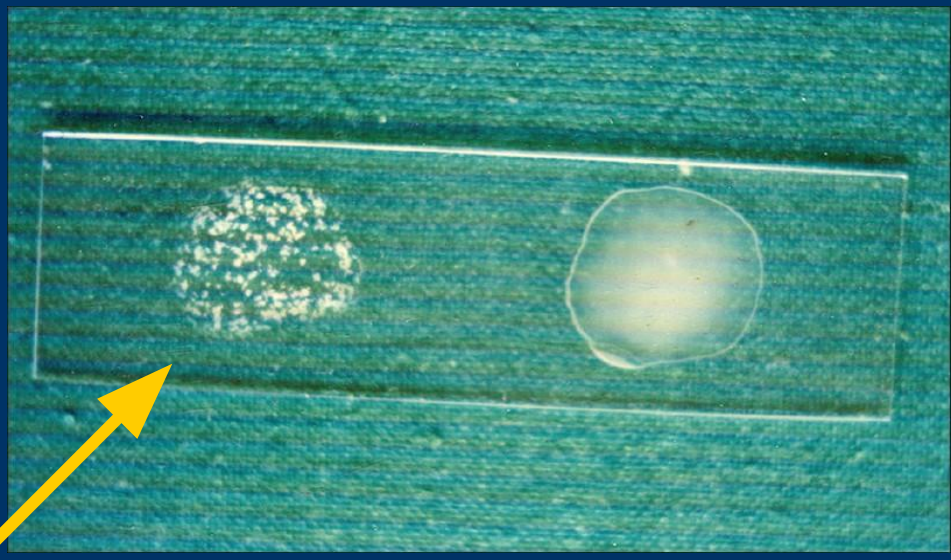
Реакция агглютинации (лат. *agglutinatio* - склеивание) - склеивание корпускул (бактерий, эритроцитов и др.) антителами в присутствии электролитов - хлорида натрия

Механизм реакции агглютинации



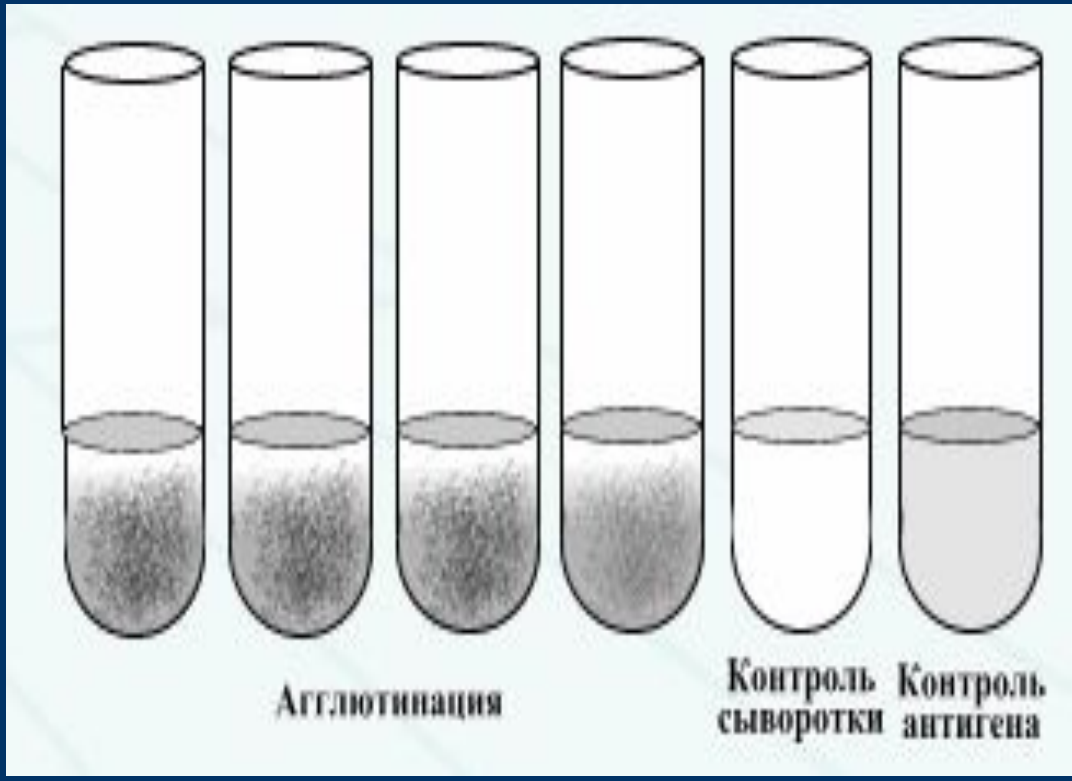
Ориентировочная реакция агглютинации на стекле

К капле диагностической агглютинирующей сыворотки добавляют взвесь бактерий, (чистая культура возбудителя выделенная от больного). **Положительная реакция – образование хлопьевидного осадка.**



Развернутая реакция агглютинации

К разведениям сыворотки больного добавляют взвесь бактерий (диагностикум).



Агглютиноскоп

Развернутая реакция агглютинации

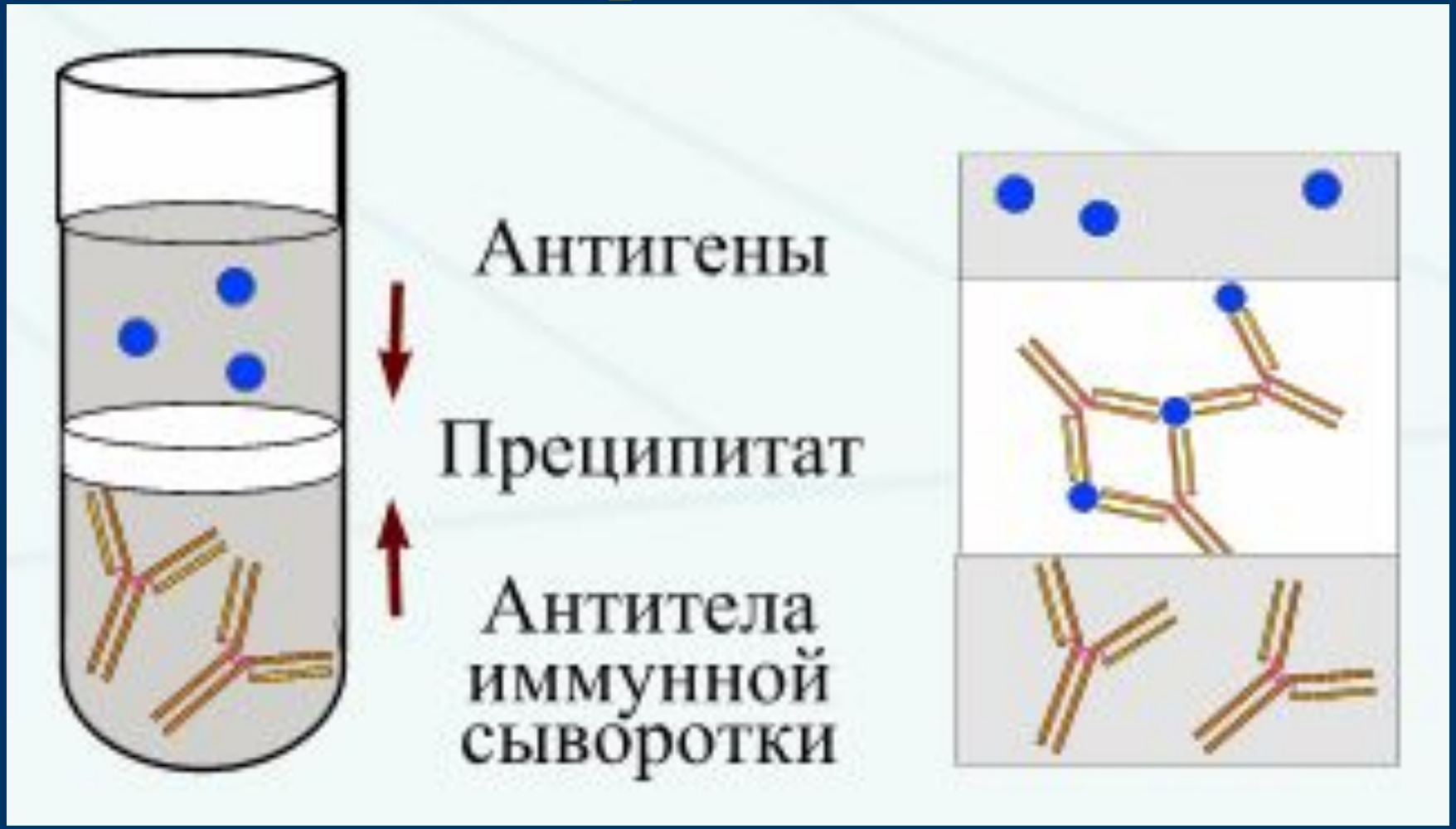
Реакцию агглютинации в пробирках (развернутая реакция агглютинации) проводят для определения титра антител к возбудителям брюшного тифа (реакция Видаля), бруцеллеза (реакции Райта).

Реакция преципитации

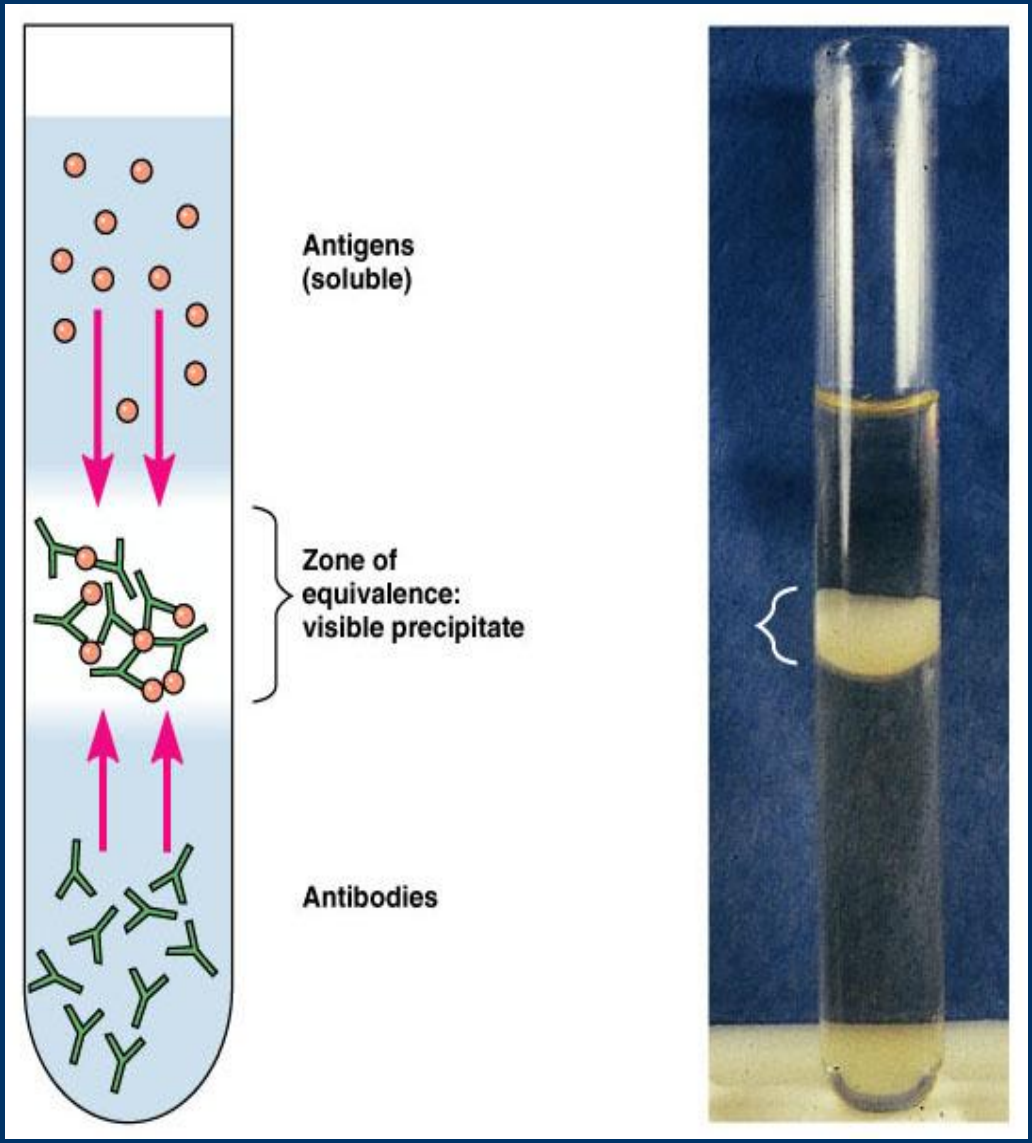
Реакция преципитации - (лат *praecipito* - осаждать) - это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого ***преципитатом***.

Реакцию преципитации ставят в пробирках (реакция кольцепреципитации), в гелях.

Схема реакции кольцепреципитации



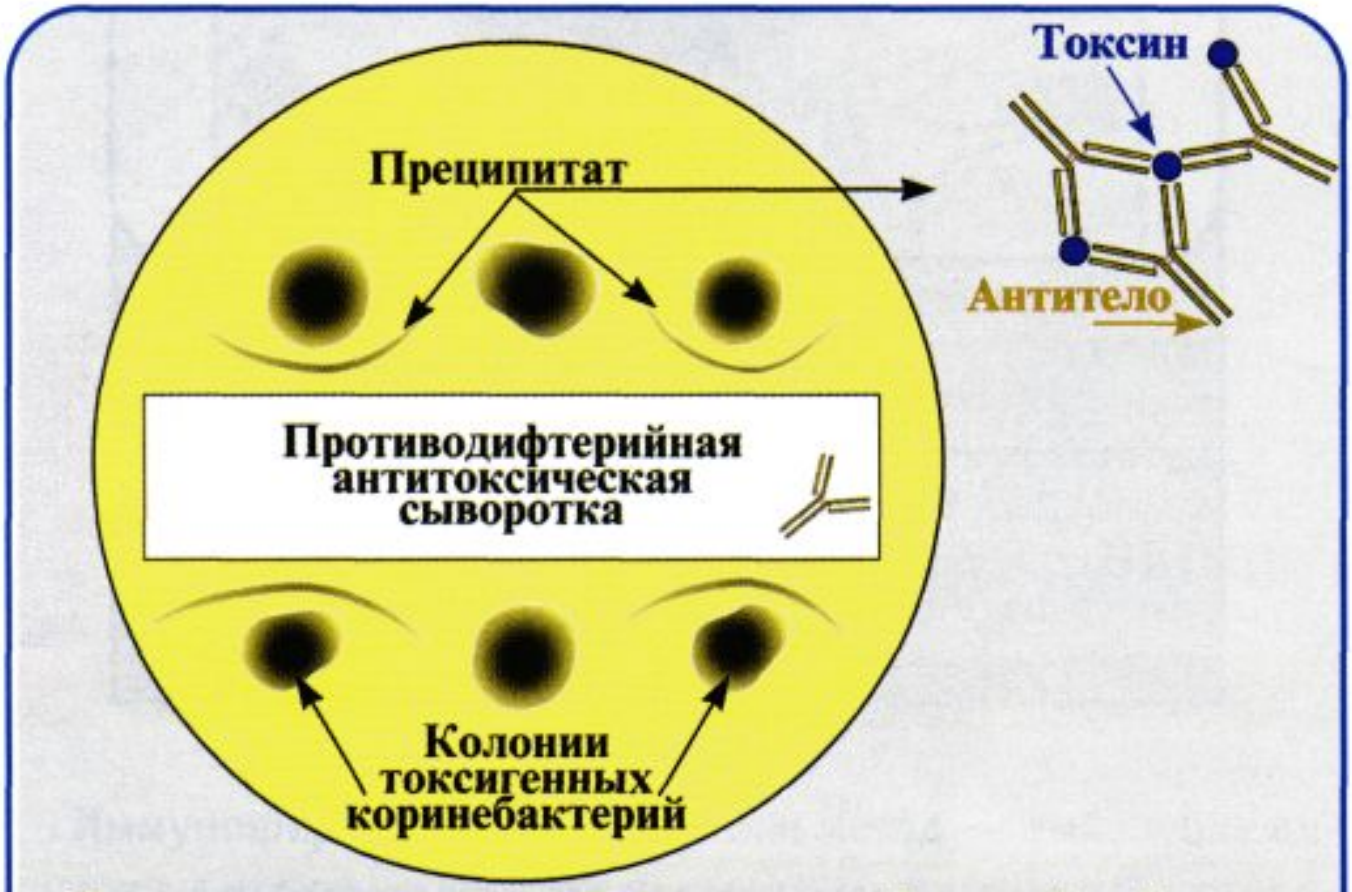
Реакция кольцепреципитации



Радиальная иммунодиффузия по Манчини

- в тонком слое геля, содержащего антитела (анти Ig) в известной концентрации, вырезают лунки;
- антиген (сыворотка крови пациента, содержащая Ig), помещенный в эти лунки, диффундирует в гель;
- вокруг лунок образуются кольца преципитации, диаметр которых пропорционален концентрации антигена (Ig).

Реакция преципитации в агаре по Оухтерлони



Определение токсигенности дифтерийной палочки (преципитация в агаре). В центре - колонии нетоксигенного штамма.

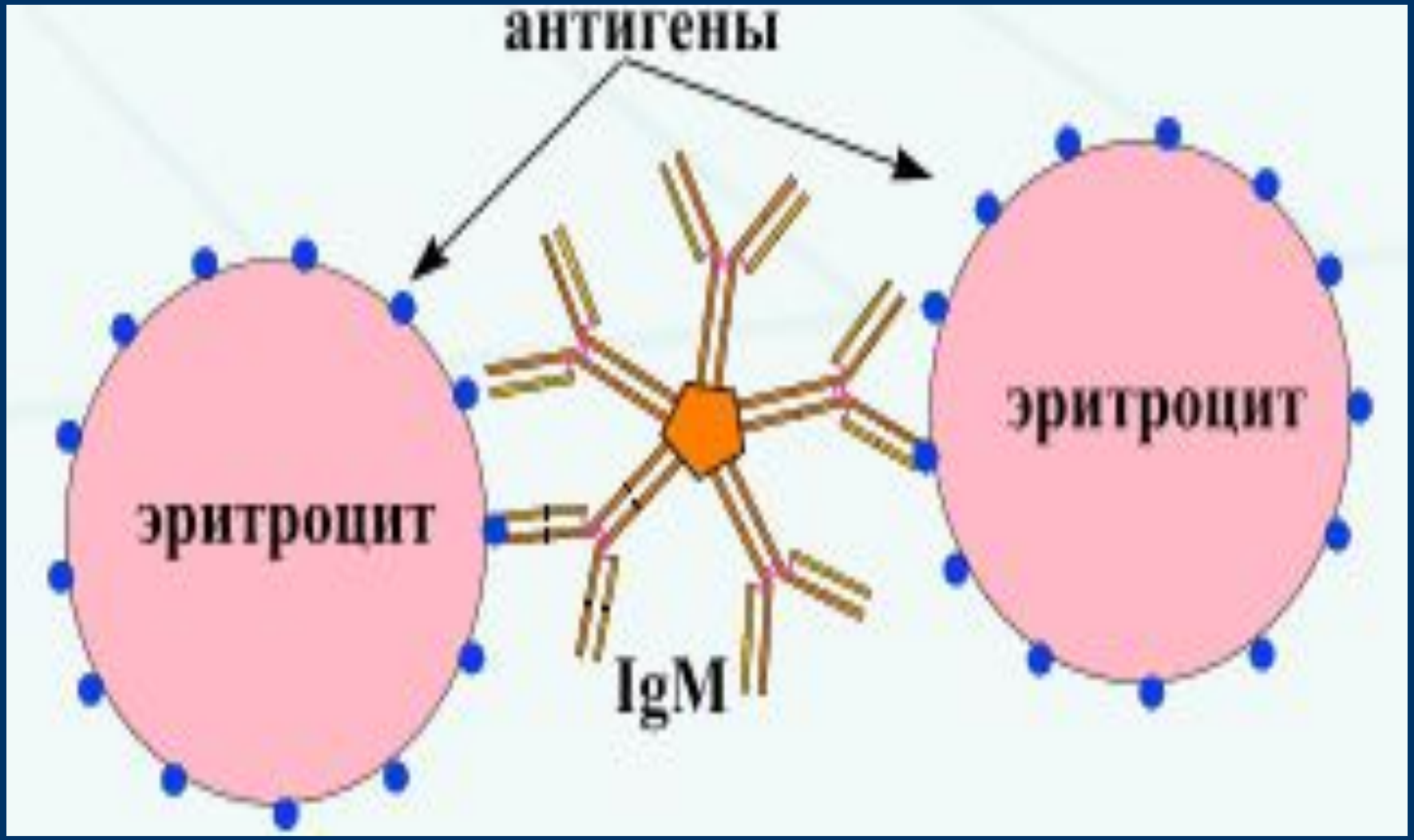
Реакция преципитации в агаре

Непрямые серологические реакции

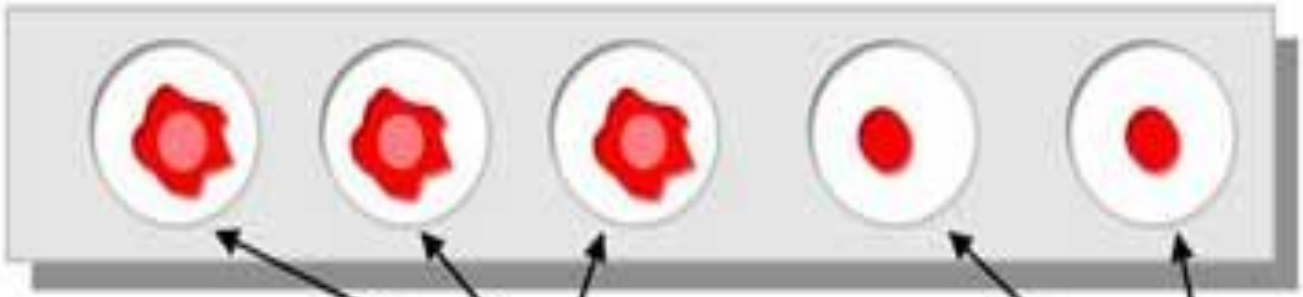
Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Антигенный эритроцитарный диагностикум

РНГА



Результат РНГА (РПГА)



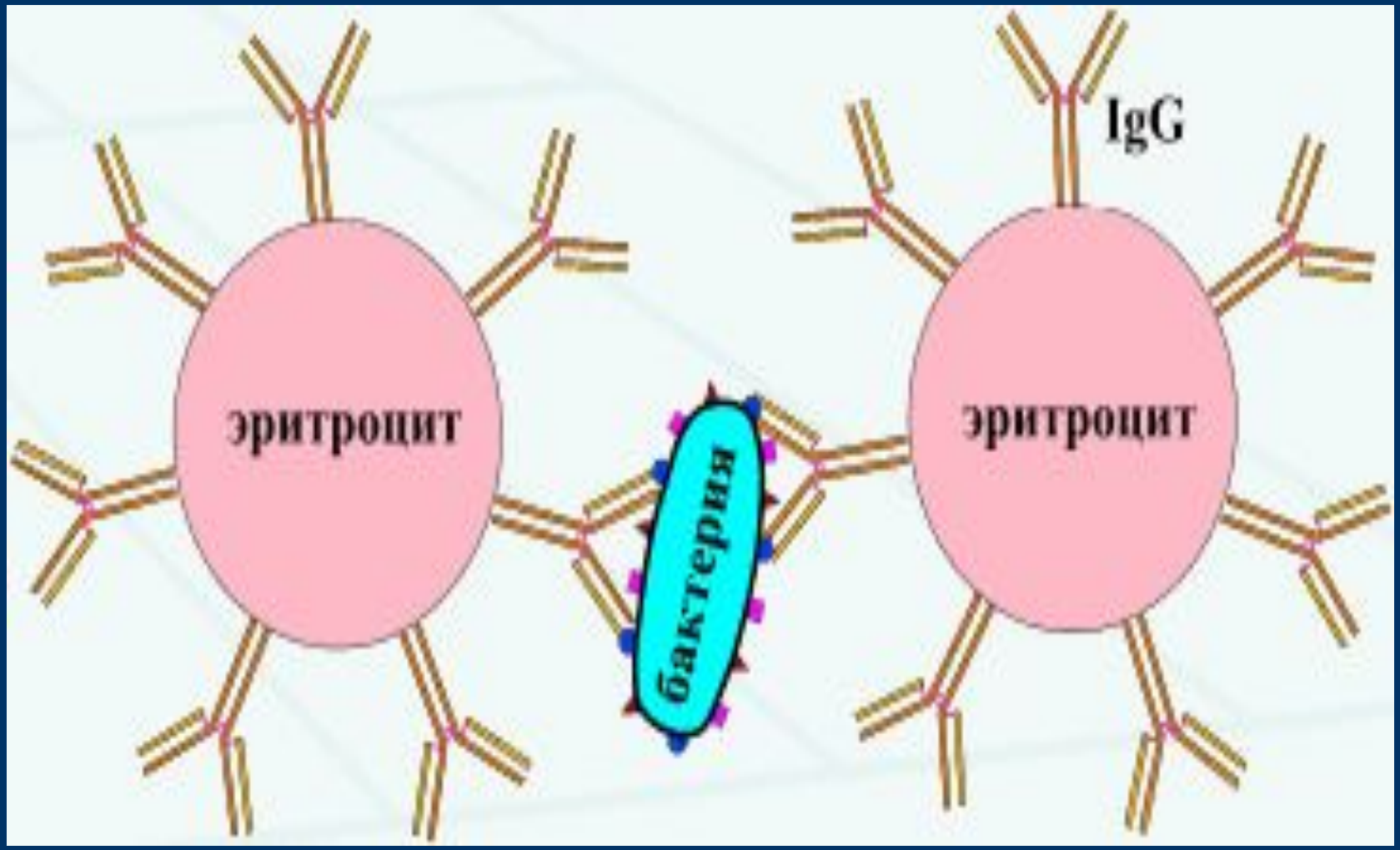
Положительный («зонтик»)

Отрицательный («пуговка»)

+ зонтик

- пуговка

Эритроцитарная диагностическая сыворотка



Реакция латекс-агглютинации

Реакция латекс-агглютинации является одним из видов реакции агглютинации, в которой в качестве носителя антигена или антитела используются синтетические полимерные частицы

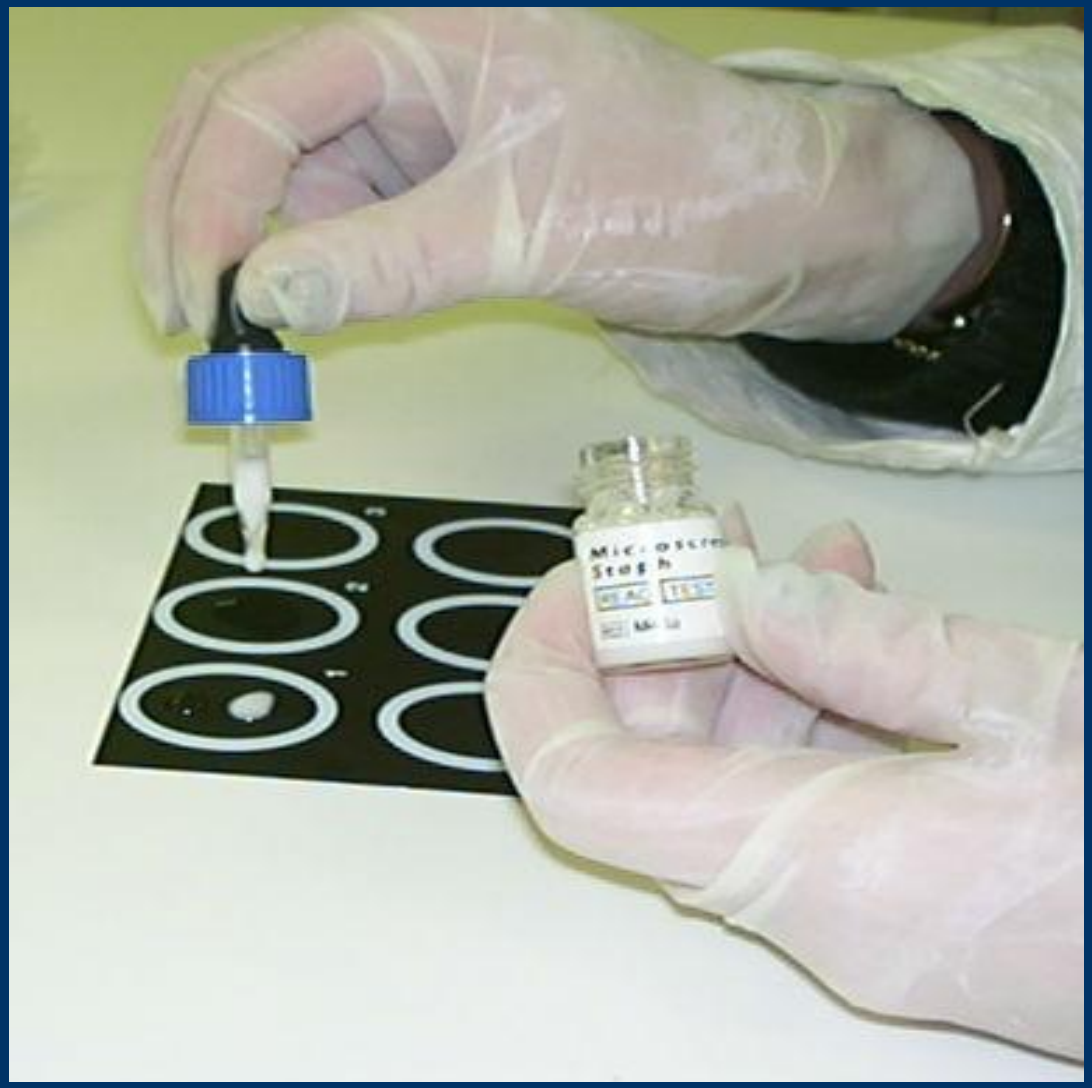
Реакция латекс-агглютинации

Для приготовления антигенного латексного диагностикума антигены бактериальной клетки белковой или полисахаридной природы адсорбируют на поверхности окрашенных частиц инертного латекса.

Такие нагруженные бактериальным антигеном латексные частицы склеиваются под действием сыворотки, содержащей антитела против данного антигена, что приводит к образованию характерного осадка

Реакция латекс-агглютинации

Реакция латекс-агглютинации



Реакция латекс-агглютинации

Идентификация чистых культур методом времяпролетной масс-спектрометрии

Масс-спектрометрический анализ

Является аналитической методом исследования, в процессе которого осуществляется измерение отношения массы заряженных частиц материи (ионов) к их заряду.

Полученный результат - спектральный сигнал - представляет собой рассортировку заряженных частиц по значению отношения молекулярной массы иона к его заряду.

Масс-спектрометрический анализ

- Для исследования применяется прибор - масс-спектрометр.
- Данный прибор включает три компонента: источник ионов (ионизатор), систему разделения ионов и систему детекции ионов.
- Ионизатор переводит исследуемый образец в ионизированную форму.

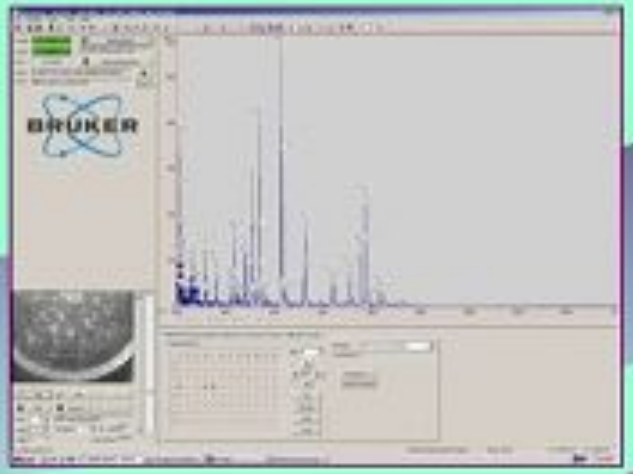
Масс-спектрометрический анализ

- Далее ионизированные компоненты образца оказываются в системе разделения ионов, которая ранжирует их по значению отношения массы иона к заряду.
- Детектор регистрирует образовавшиеся и рассортированные ионы, позволяя генерировать визуальный спектр, на котором в виде пиков различной интенсивности представлены отношения массы иона к заряду всех ионизированных компонентов исследуемого образца.

Масс-спектрометрический анализ

- **Использование в качестве исследуемого образца чистой культуры микроорганизма или его экстрактов позволяет получить спектр, характеризующий качественный молекулярный состав исследуемого объекта.**
- **Получаемый результат позволяет идентифицировать микроорганизм до вида, а в некоторых случаях осуществить и внутривидовую дифференциацию.**

Масс-спектрометрическая видовая идентификация



Видовая идентификация микроорганизма занимает от 2-х до 5-ти минут

Диагностика вирусных инфекций

Диагностика вирусных инфекций

В лабораторной диагностике вирусных заболеваний используются:

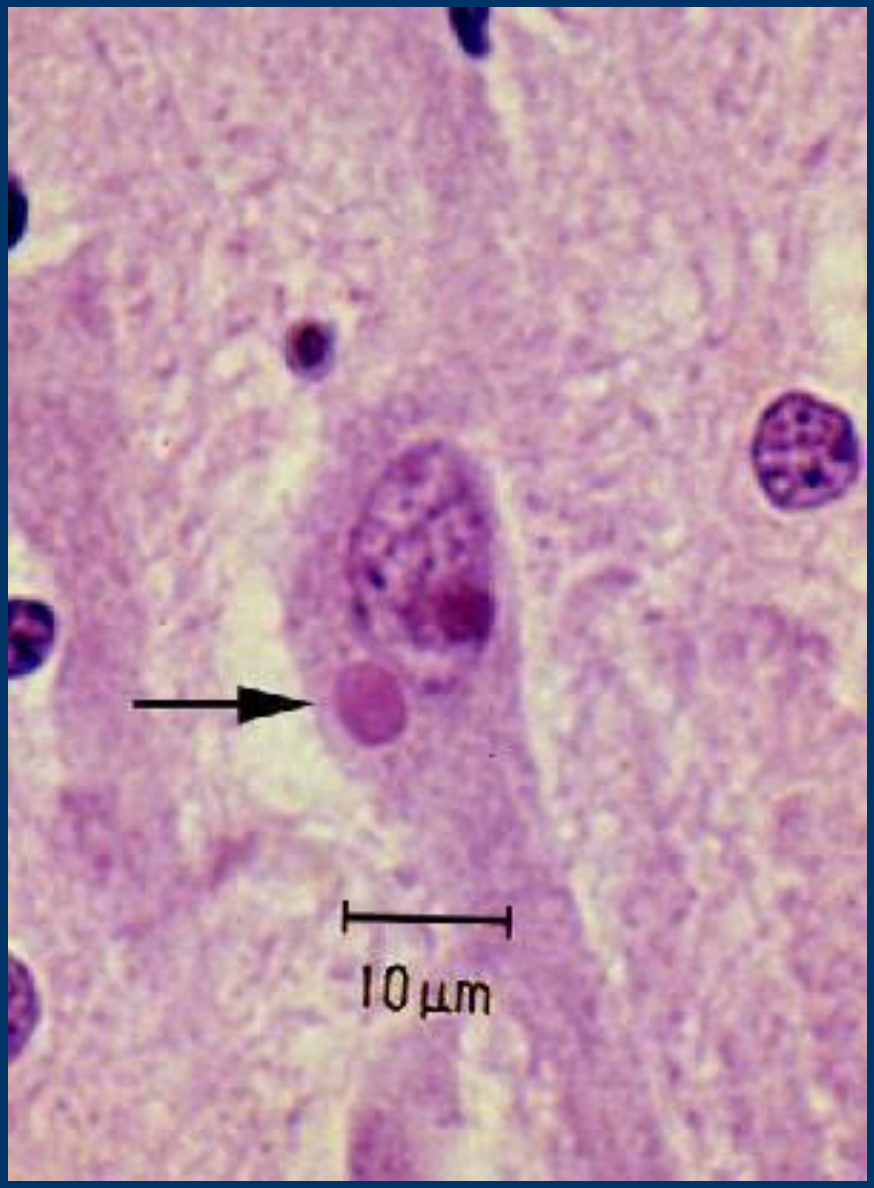
- **Вирусоскопическое исследование. Световая и электронная микроскопия дает возможность выявить наличие вирусных включений и сами вирусы и идентифицировать их.**
- **Вирусологическое (культуральное) исследование.**
- **Серологическое исследование для обнаружения антител и антигенов. Используются реакции гемагглютинации, ИФА, имуннобллоттинг.**
- **Молекулярно-генетические методы.**

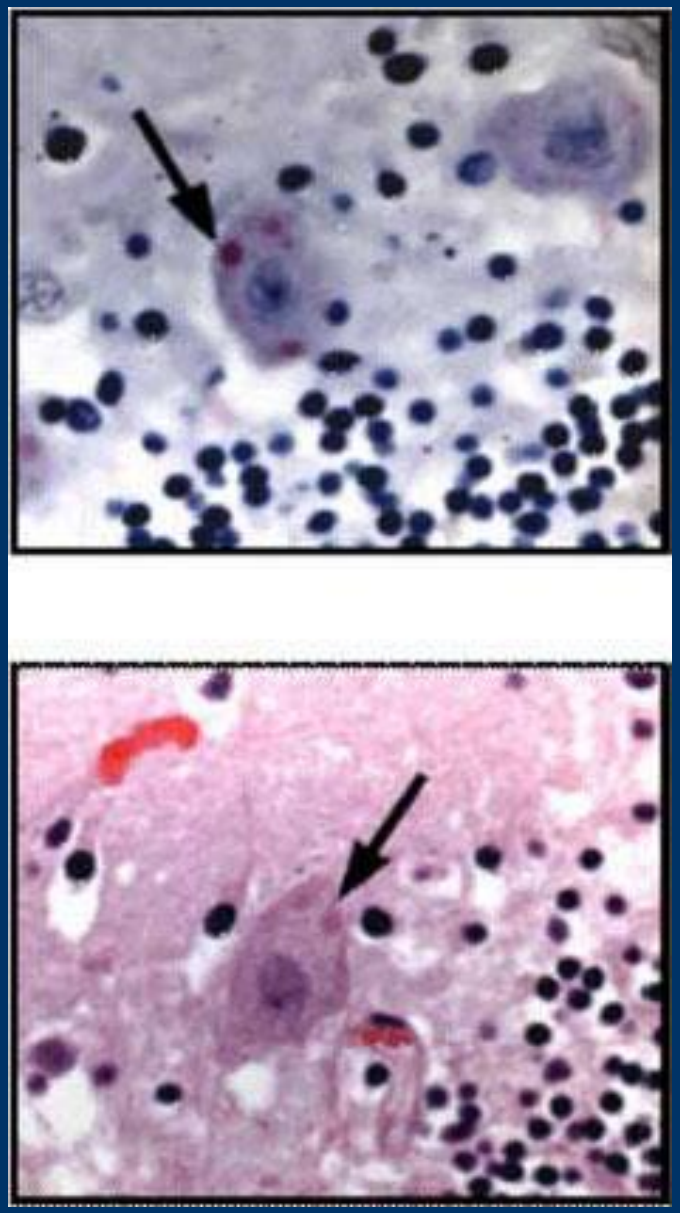
Вирусоскопический метод

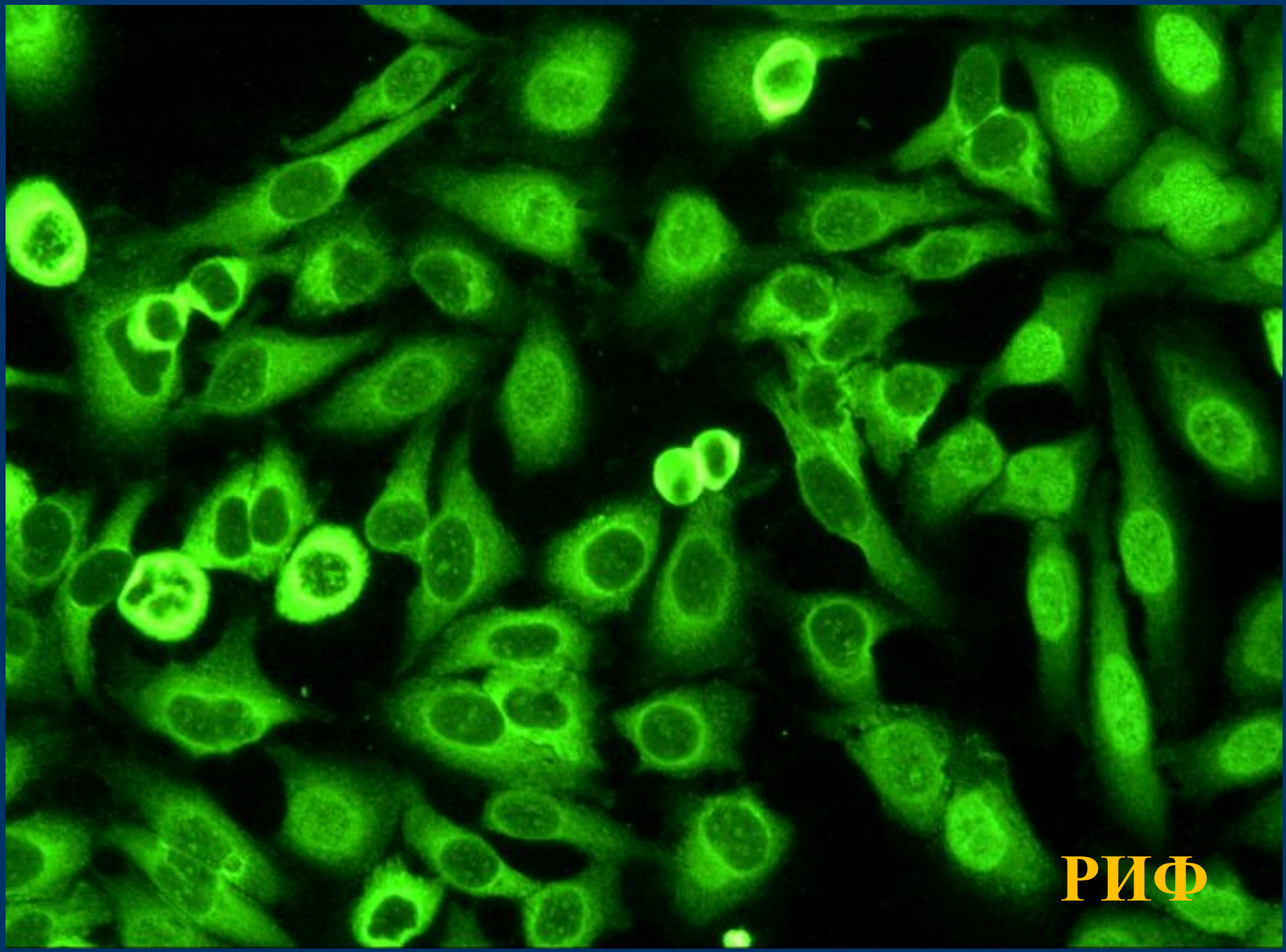
- Электронная микроскопия (разрешающая способность электронного микроскопа составляет 0,1 нм).
- Световая микроскопия (специфические цитоплазматические или внутриядерные включения, образующиеся при репликации вируса в инфицированных клетках). Например, эозинофильные включения Бабеша-Негри в нейронах погибших от бешенства людей и животных.
- Реакция иммунофлюоресценции (РИФ).

электронная микроскопия

Тельца Бабеша-Негри



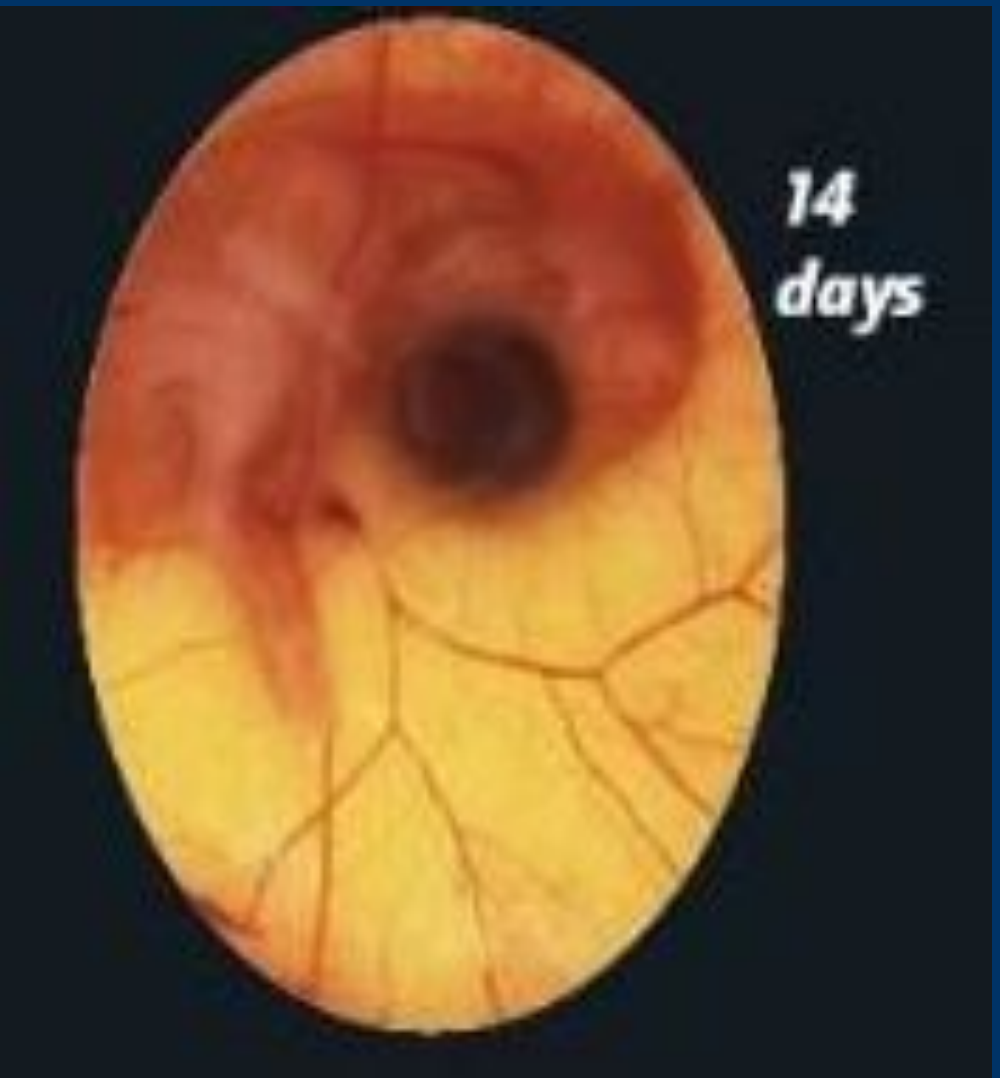



РИФ

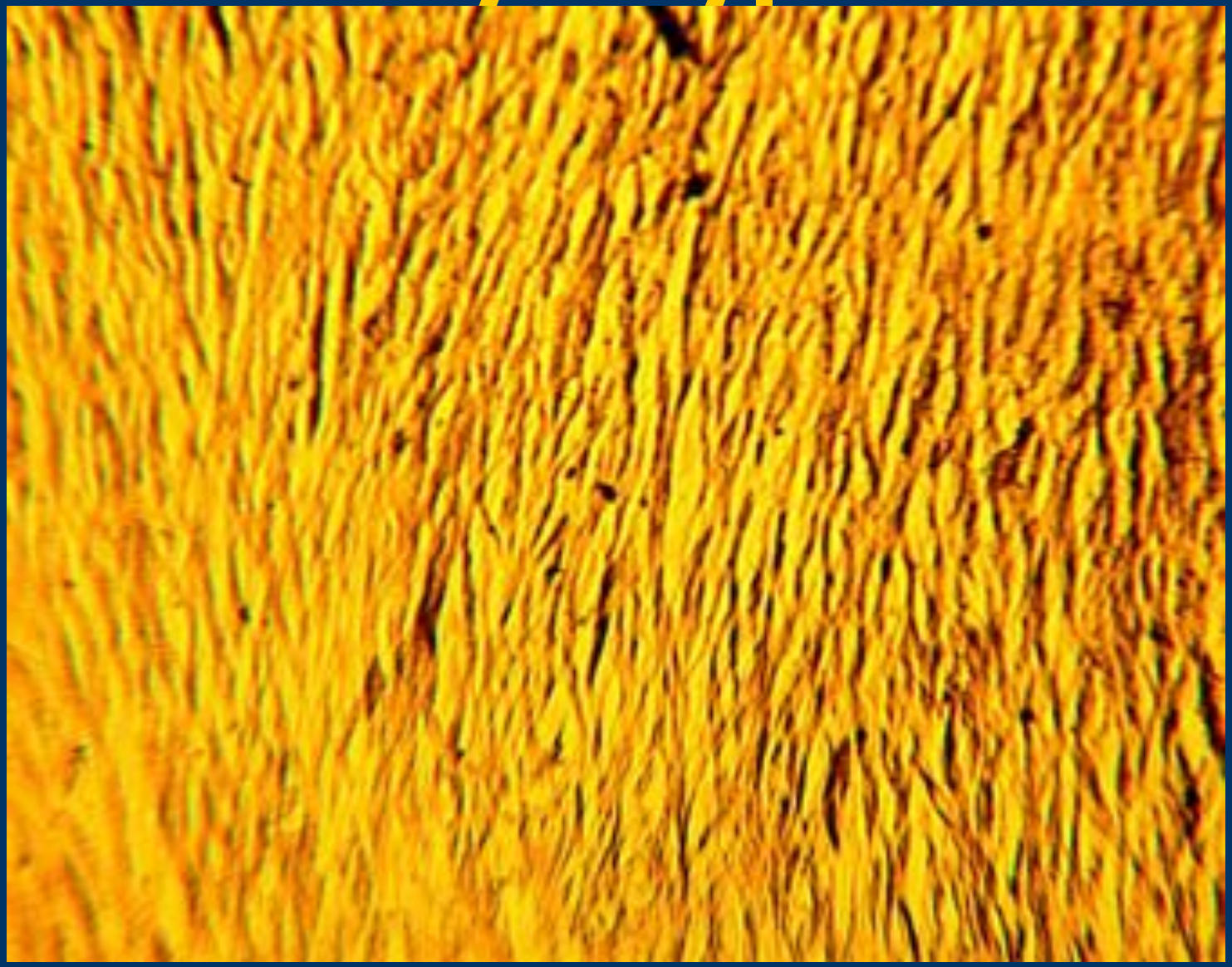
Культивирование вирусов

- **Путем заражения лабораторных животных.**
- **Путем заражения куриных эмбрионов.**
- **Путем заражения клеточных культур, которые получают из нормальных или трансформированных клеток человека и животных.**

куриные эмбрионы

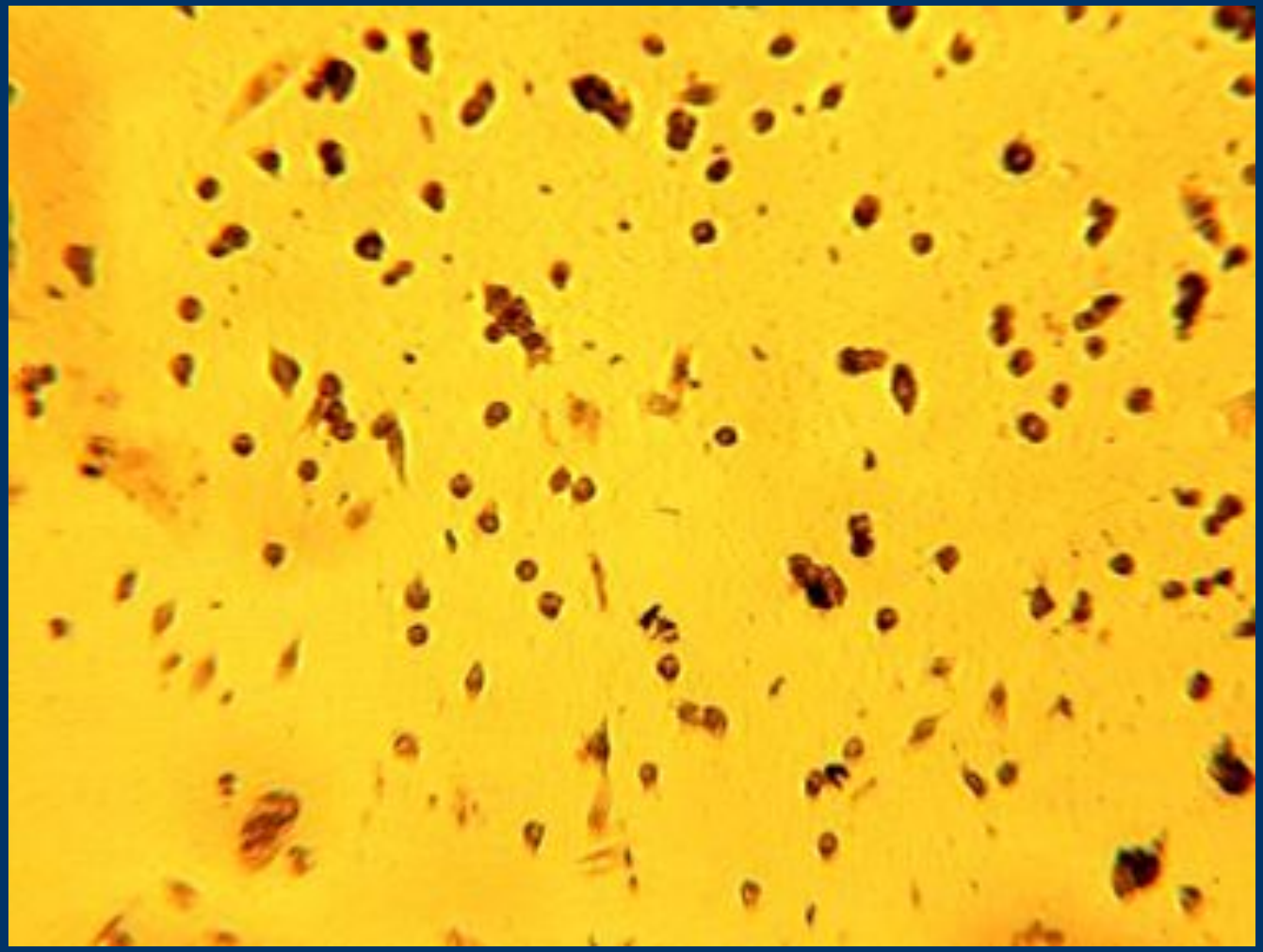


Монослой клеточных культур



Монослой пораженных вирусом клеток

Цитопатическое действие вируса (ЦПД)



Реакция нейтрализации вирусов

Реакция нейтрализации применяется в двух направлениях:

1.для идентификации вирусов;

2. для серодиагностики вирусных инфекций, т.е. для определения нарастания титра вируснейтрализующих антител в «парных» сыворотках.

.

Реакция нейтрализации вирусов

Компоненты:

- **Исследуемый вирус (при идентификации выделенною вируса) или исследуемая сыворотка (при серодиагностике инфекции).**
- **Диагностическая (группе-, видо-, типоспецифическая) сыворотка (при идентификации вируса) или известный вирус — диагностикум (при серодиагностике).**
- **Индикаторный объект: животные, куриные эмбрионы, культуры тканей.**

Смесью вирус (исследуемый или известный) + сыворотка (диагностическая или исследуемая), выдержанной в течение определенного времени, заражают культуру клеток, куриный эмбрион или лабораторное животное.

При положительной реакции, т.е. при нейтрализации вируса антителами индикаторные объекты продолжают нормально существовать, а в контроле — гибель или характерные изменения.

Диагностика вирусных инфекций

Серологический метод:

- **исследуют парные сыворотки крови пациента,**
- **Применяют ИФА.**

Дома

Иммунологические методы диагностики инфекционных заболеваний и молекулярно-генетические

- **Принцип иммуноферментного анализа (ИФА)**
- **Принцип иммуноблотинга**
- **Возможности и ограничения иммунологических методик в диагностике инфекционных заболеваний**
- **Основные принципы полимеразной цепной реакции (ПЦР)**
- **Состав реакционной смеси для ПЦР**
- **Роль праймеров в ПЦР-исследовании**
- **Принцип работы амплификатора**
- **Детекция ампликонов в агарозном геле**
- **Детекция ампликонов по флуоресценции**
- **ПЦР в реальном времени и ПЦР с обратной транскрипцией: принципы методов**
- **Применение ПЦР в реальном времени в медицине**
- **Применение ПЦР с обратной транскрипцией в медицине**
- **Возможности и ограничения молекулярно-генетических методик в диагностике инфекционных заболеваний**