

Приволжский исследовательский медицинский университет

Кафедра эпидемиологии, микробиологии и доказательной
медицины

Бактериологический анализ (культуральный метод)

Лектор: д.б.н. профессор Заславская М. И.

Принципы микробиологической диагностики инфекций



*Культуральный
метод*
(**выделение
чистой культуры
и идентификация
патогена**)

Экспресс – диагностика

1. Микроскопия.
2. Молекулярно-генетический анализ:
 - обнаружение антигенов,
специфических метаболитов
 - индикация нуклеиновых кислот

Серодиагностика
(**исследование
сыворотки крови на
наличие антител к
патогену**)

Культуральный метод

Это наиболее надежный метод в лабораторной диагностике бактериальных инфекций и считается «**золотым стандартом**» в бактериологии (реже используется при исследовании вирусных инфекций).

Особенность метода - его многоэтапность.

Культуральный метод (бактериологический анализ) включает выделение и накопление чистой культуры бактерий с ее последующей идентификацией.

Некоторые бактерии обладают резистентностью к антибиотикам, поэтому бактериологический анализ может включать определение чувствительности выделенной чистой культуры к антибиотикам.

Бактериологический анализ

основной метод микробиологической диагностики, являющийся «золотым стандартом» микробиологии.



Цель: выявление и последующая идентификация патогенного микроорганизма в исследуемом материале.

Общие правила

Пробы биоматериала необходимо собирать следующим образом:

1. до начала антибактериальной терапии, или перед повторным введением (приемом) препаратов;
2. в количестве (вес, объем), необходимом для выполнения анализа
3. с минимальным загрязнением материала нормальной микрофлорой, т.к. ее наличие приводит к ошибочной трактовке результатов

4. Все собранные пробы отправляют в микробиологическую лабораторию **немедленно** после получения, за исключением случаев использования емкостей с транспортировочными средами, разрешенными к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном порядке.

Допускается хранение проб в **холодильнике** при температуре 2-8 °С, или в специализированной транспортировочной емкости (транспортировочная система), разрешенной к применению в установленном порядке, представляющей собой стерильную одноразовую пробирку с агаризованной или жидкой **транспортировочной средой** и зондом-тампоном, вмонтированным в пробку и стерильно упакованным вместе с пробиркой. В таких емкостях пробы хранят при комнатной температуре (18-20 °С).

Правила забора биологического материала

**МУ 4.2.2039-05 Техника сбора и транспортирования биоматериалов в
микробиологические лаборатории
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**

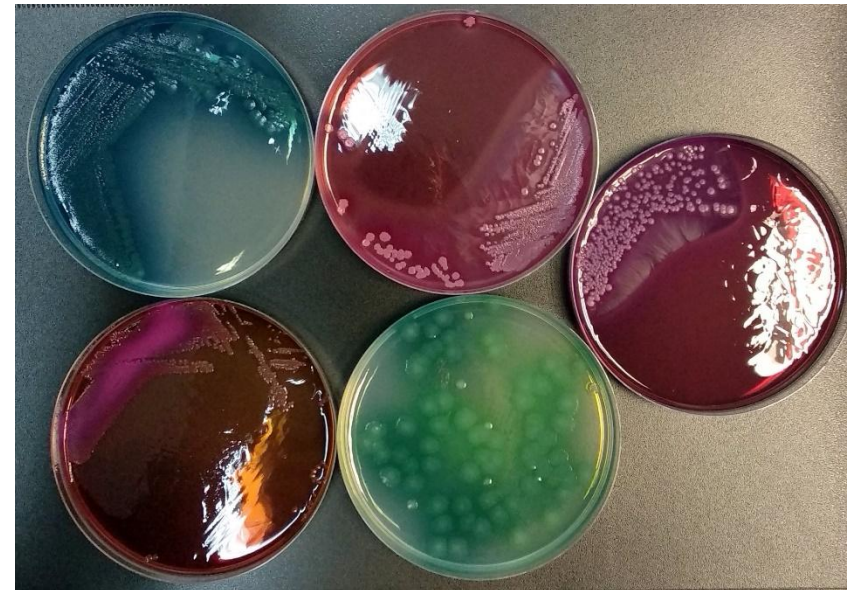
**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

Техника сбора и транспортирования биоматериалов в
микробиологические
лаборатории

Дата введения 2006-07-01

Этапы бактериологического анализа

- Посев нативного материала на питательные среды
- Выделение чистой культуры возбудителя
- Идентификация возбудителя
- Постановка антибиотикограммы



Цель микробиологического исследования- получение чистой культуры

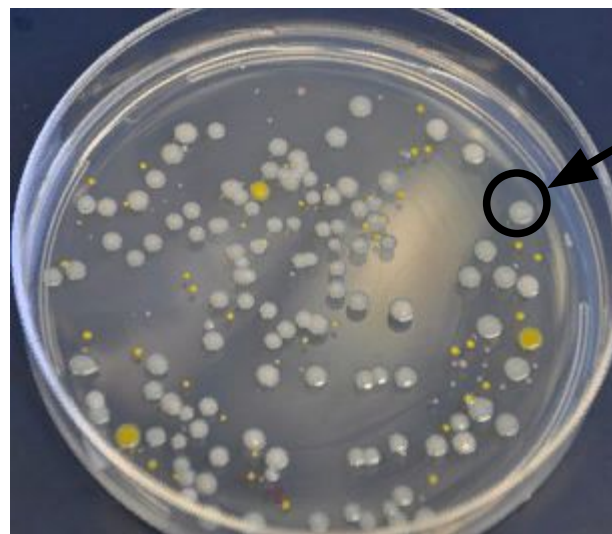
Штамм - это чистая культура микроорганизмов, выделенных из определенного источника в определенное время. Штамм - более узкое понятие, чем вид.

Разные штаммы одного и того же вида могут отличаться по ряду свойств, например вирулентности, чувствительности к антибиотикам и др.

Чистая культура

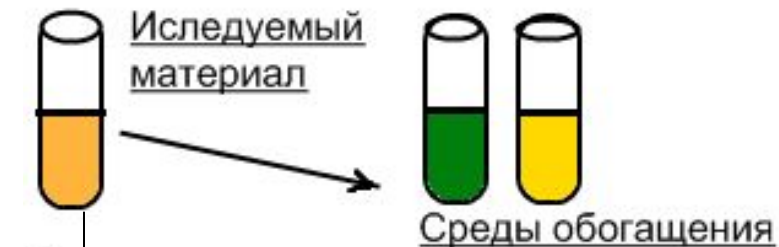
Клон - совокупность генетически идентичных клеток, потомков одной единственной микробной клетки.

При росте микроорганизмов на плотной питательной среде потомство одной клетки в результате роста и размножения становится видимым невооруженным глазом и воспринимается как изолированное скопление бактерий одного вида, называемое *колонией*



КОЛОНИЯ

I этап



II этап

1. Бактериоскопия



2. Изучение культуральных свойствагагар

3. Посев на скошенный

III этап

2. Бактериоскопия



идентификация

IV этап

Постановка
антибиотикограммы

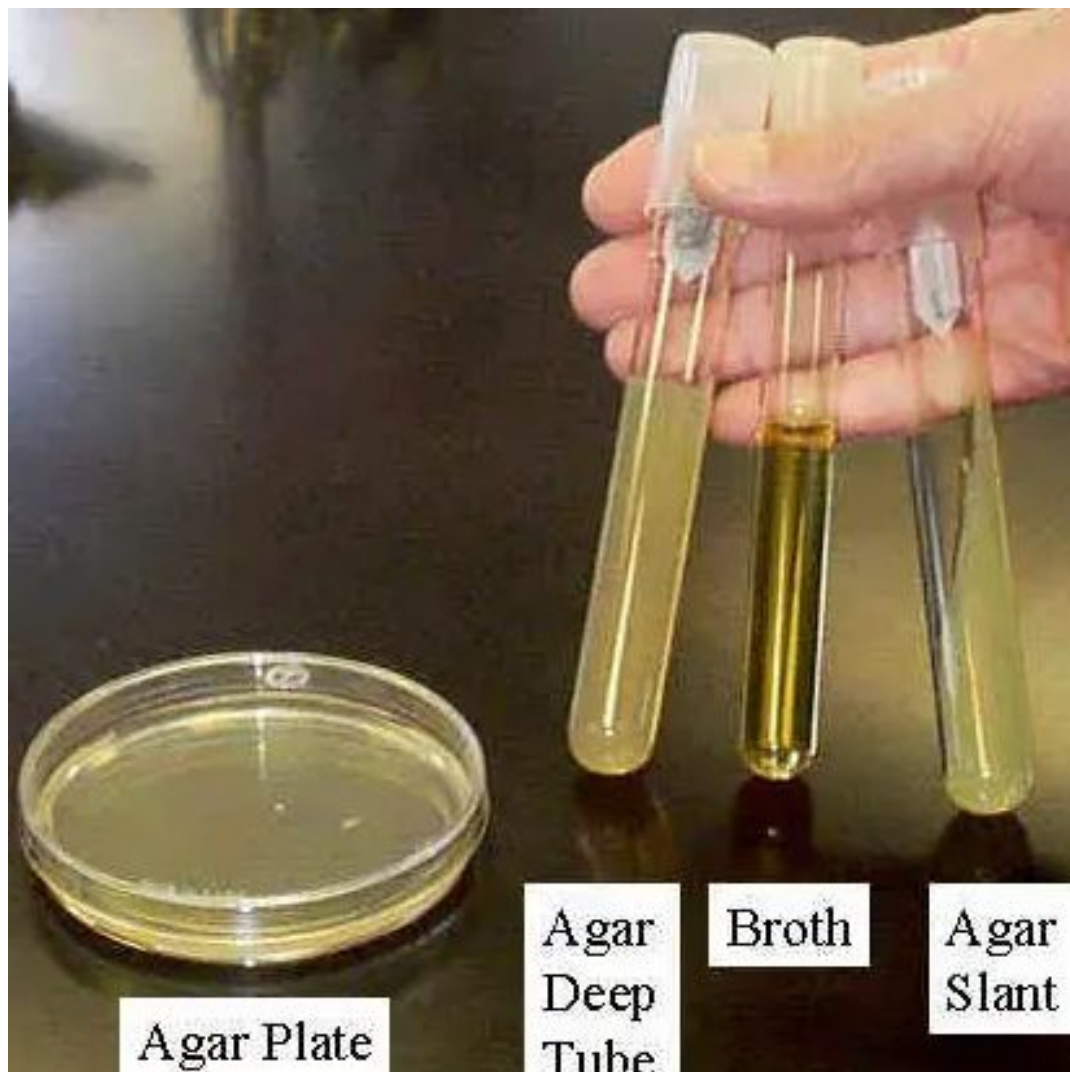
Учёт результатов.

Первый этап

включает работу с нативным материалом

Цель – получение изолированных колоний

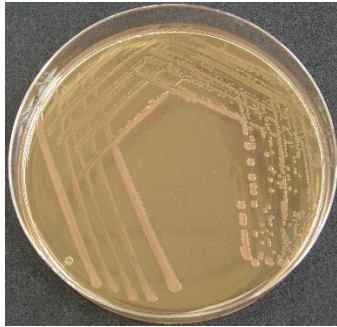
- Подготовка материала к исследованию
- Посев на плотные питательные среды для получения изолированных колоний
- Инкубация при 37°C, в течение 18-48 часов (в зависимости от предполагаемого возбудителя)



Варианты питательных сред (слева направо):
чашка Петри с мясо-пептонным агаром (МПА), столбик МПА в пробирке,
мясо-пептонный бульон в пробирке, скошенный МПА в пробирке.

Плотные питательные среды

1. Простые (например, МПА)



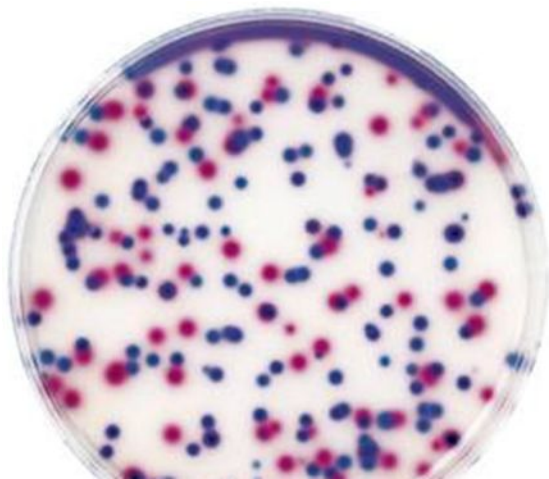
2. Сложные

- Специальные (кровяной агар)
- Селективные (Эндо, Сабуро, ЖСА)
- Дифференциально-диагностические (Эндо, ЖСА), **хромогенные среды**



Хромогенные (флюорогенные среды) среды – это среды нового поколения, которые позволяют проводить быстрое обнаружение и идентификацию микроорганизмов.

Хромогенные (флюорогенные) питательные среды позволяют выявить специфические ферментативные активности для разных микроорганизмов. Идентификация микроорганизмов возможна уже на этапе первичного посева, в результате происходит сокращение времени исследования и получаем ускоренный результат!



Fluorocult® LMX



Изменение цвета среды



Флюоресценция среды в УФ-свете при 366 нм

Принцип действия.

Хромогенные среды включают хромогенные субстраты для выявления специфических ферментативных активностей микроорганизмов, характерных для группы (например, колиформы) или отдельного вида микроорганизмов.

Исследуемый микроорганизм содержит фермент, который метаболизирует бесцветный хромогенный субстрат, образуя окрашенный продукт реакции.

Хромогенная среда контрастно изменяет свой цвет (или флюоресцирует) при обнаружении исследуемого микроорганизма.

Нет необходимости в проведении пересевов и постановке дальнейших биохимических тестов для идентификации микроорганизмов.

Второй этап:

характеристика колонии, накопление чистой культуры

- Изучение и описание культуральных свойств полученных микроорганизмов (размер, цвет, характер края колоний, наличие гемолиза и т.д.)
- Микроскопия - окраска по Граму морфология возбудителя (кокки, палочки и т.д.)

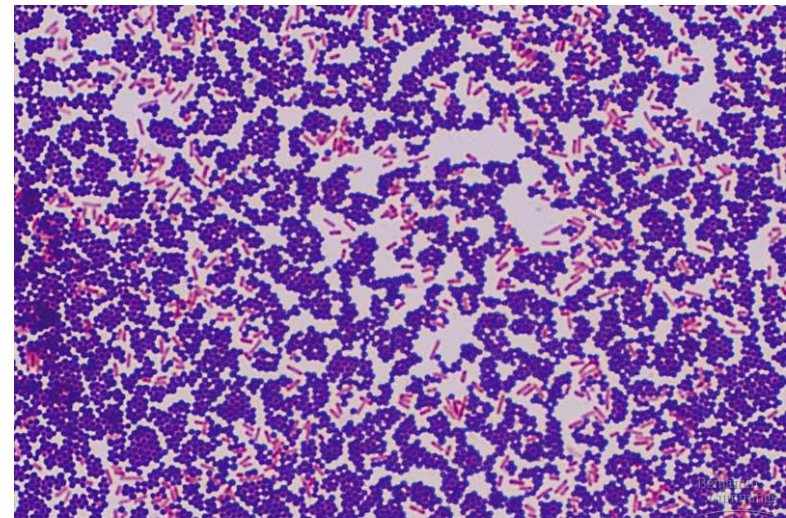
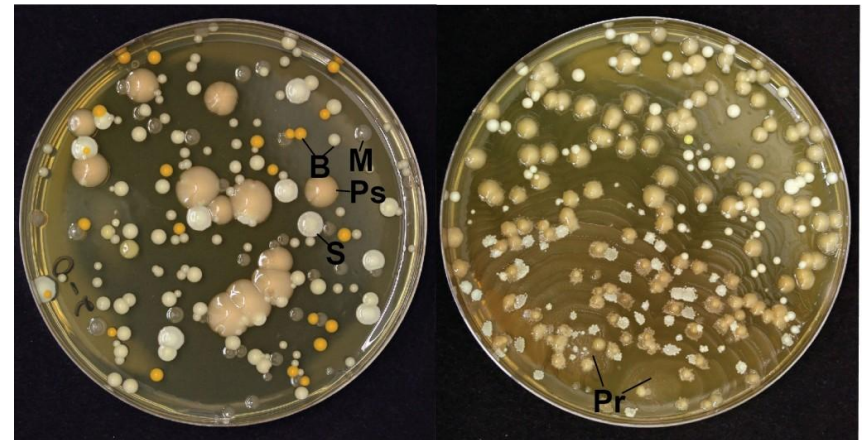
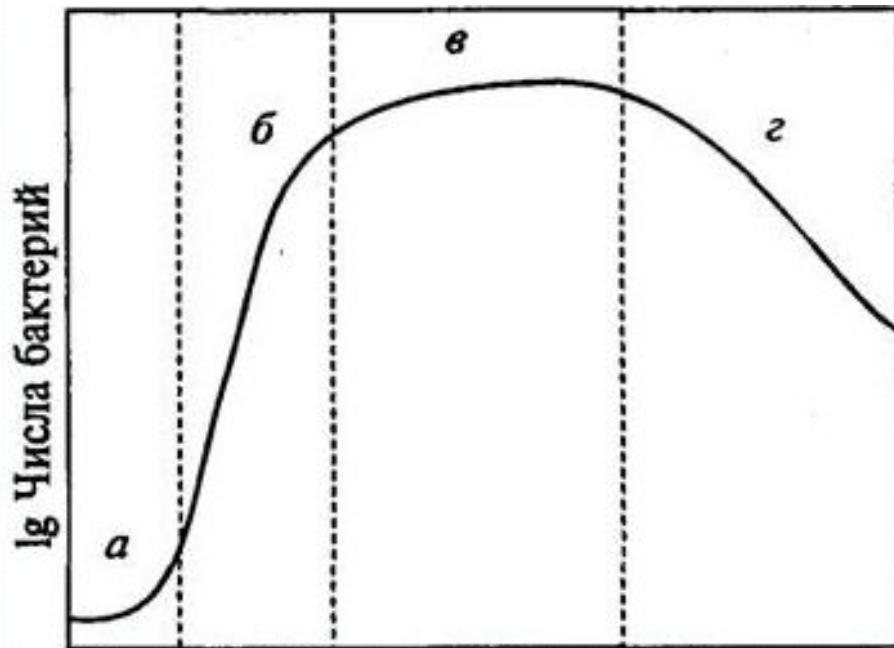


График роста и размножения бактерий на питательных средах



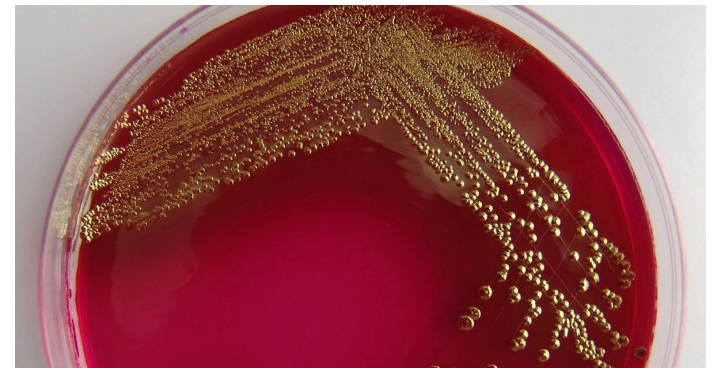
- а — **лагфаза** (бактерии приспосабливаются к новой среде);
- б — **фаза роста** (размножение идет с нарастающей скоростью);
- в — **стационарная фаза** (число образующихся клеток соответствует числу отмерших);
- г — **фаза отмирания** (клетки теряют жизнеспособность и погибают)

Культуральные свойства

Внешний вид колоний (культуральный признак) является важной характеристикой бактерий, так как каждому виду микробов при росте на определенной питательной среде присущи типичные характеристики (структура, размер, форма, цвет и т.д.)



Колонии эшерихии на кровяном агаре



Колонии эшерихии на среде Эндо

Основные характеристики бактериальных колоний

- 1. Форма



Правильная,
круглая



неправильная

- 2. Поверхность (матовая, блестящая, исчерченная и т.д)



гладкая



морщинистая

Основные характеристики бактериальных колоний

3. Размер (диаметр в мм)

4. **Расположение колонии на поверхности среды:** выпуклое, плоское, вдавленное.



Фото К.Лавров latrov.ko@gmail.com

выпуклые



плоские

Основные характеристики бактериальных колоний

5. Консистенция (сухая, влажная, слизистая)



слизистая



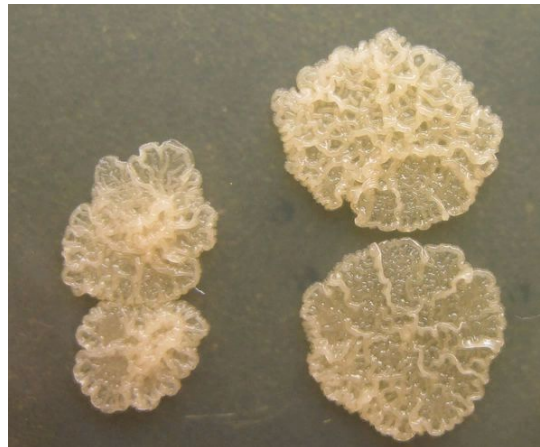
сухая

Основные характеристики бактериальных колоний

- **6. Характер края** (ровные, фестончатые, зубчатые). Некоторые бактерии не образуют колоний определенной формы, а распространяются по всей поверхности питательной среды, например, «ползущий» рост *Proteus spp.*



Ровный край



Фестончатый край



Рост *Proteus spp.*

Основные характеристики бактериальных колоний

7. Цвет колонии



Фото К.Лавров lavrov.ko@gmail.com

пигментированные



ASM MicrocolElibrary © Butan

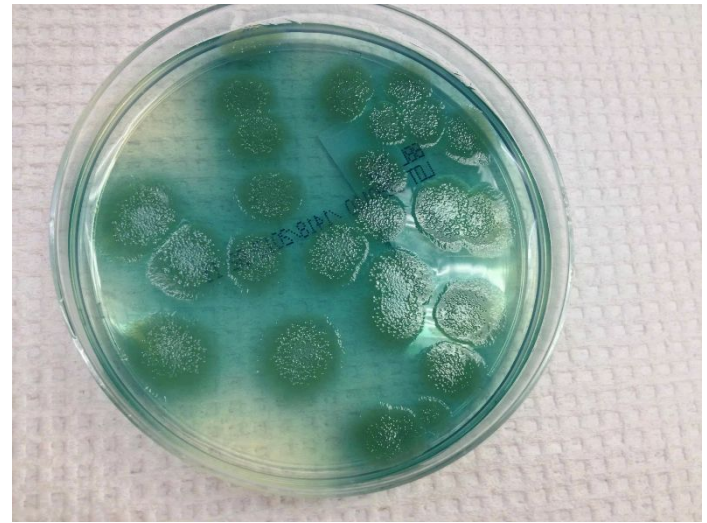
непигментированные

Основные характеристики бактериальных колоний

8. Изменение среды вокруг колонии



Наличие гемолиза



Окрашивание среды
водорастворимым пигментом
Ps. aeruginosa

Основные характеристики бактериальных колоний

Некоторые бактерии способны формировать несколько типов колоний.

При этом, колонии **S-типа** - гладкие, слизистые, круглой формы, влажной консистенции.

Колонии **R-типа** - большие, с шероховатой поверхностью, неправильной формы, сухой консистенции. Выделяют также промежуточные типы.

Как правило, микроорганизмы, формирующие S-тип колоний, более вирулентны, чем R-типы.

2- этап . Накопление чистой культуры. Пересев на скошенный агар

С целью увеличения биомассы микроорганизма микроорганизмы пересевают на скошенный агар или жидкие питательные среды (реже).

Увеличение биомассы необходимо для проведения идентификации микроорганизма

Иногда данный этап можно пропустить, если после первичного посева получено достаточное количество чистой культуры и нет риска загрязнения



Чистая культура бактерий через 24 часа после посева на скошенный агар

III этап

Цель: идентификация выделенной чистой культуры

1. Микроскопия – подтверждение чистоты культуры! Предварительная идентификация



2. Изучение ферментативной активности
3. Серотипирование
4. Масс-спектрометрия (MALDI-TOF)

**Окончательная
идентификация**

Дополнительно (если нужно) – фаготипирование бактерий

Идентификация:

исследование ферментативной (биохимической) активности бактерий/микровицетов

Ферменты микроорганизма расщепляют субстраты, что дает окрашенные продукты (результат изменения цвета индикатора при изменении рН среды).

Применяются биохимические панели, планшеты и пр. тест-наборы.



Четвертый этап

Учитывают **результаты** **идентификации** и по совокупности полученных данных, опираясь на классификацию и характеристику типовых штаммов определяют вид выделенных культур.

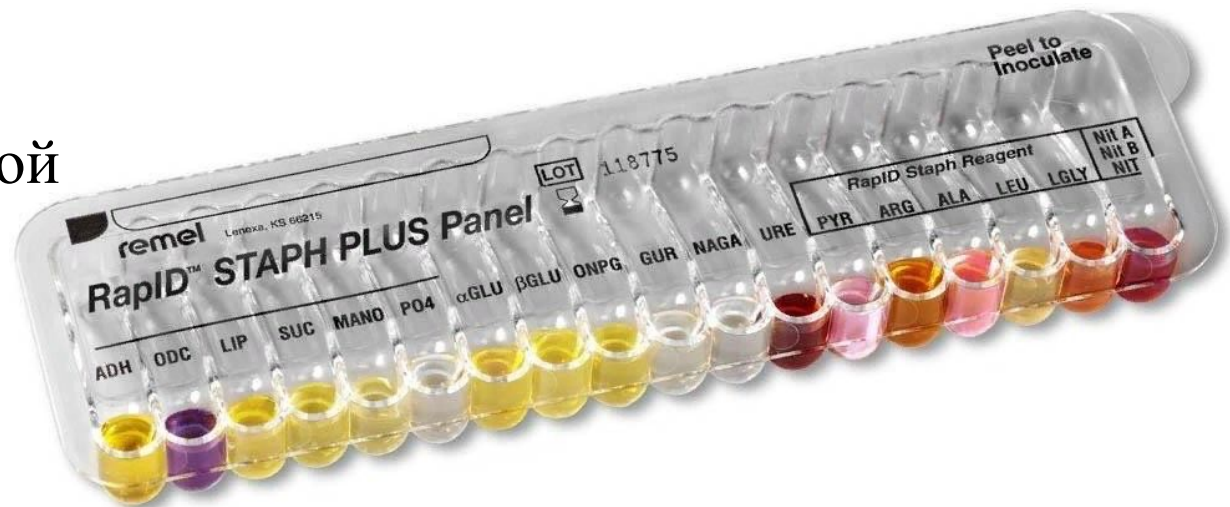
Четвертый этап

1. Учитывают результаты биохимической или иной идентификации чистой культуры и определяют вид бактерий/ микромицетов
2. Учет результатов антибиотикограммы
3. Учет результатов чувствительности бактерий к фагам

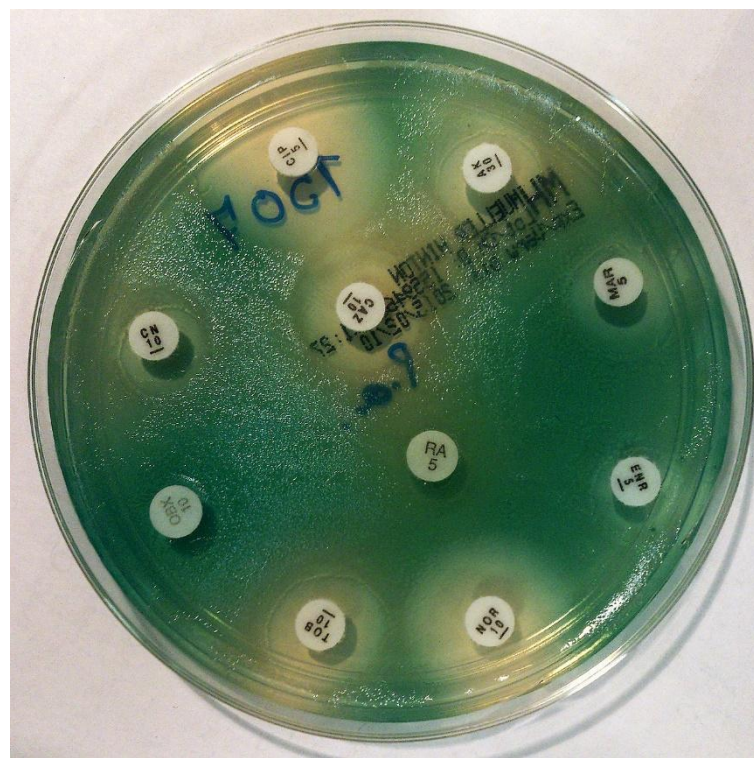
Биохимическая идентификация



Определение
ферментативной
активности
бактерий



Оценка результатов (антибиотикограммы) резистограммы



Достоинства культурального метода

- Относительно высокая чувствительность
- Возможность проведения качественного и количественного исследования
- Возможность исследования чувствительности к антибиотикам и бактериофагам

Недостатки бактериологического анализа

- Длительность исследования – минимум 3-4 дня
- **Высокие требования к забору материала**
- Невозможность использования для вирусов и некоторых бактерий, не растущих на питательных средах

Методы идентификации микроорганизмов

```
graph TD; A[Методы идентификации микроорганизмов] --> B[Культуральный]; A --> C[Культурально-зависимые]; A --> D[Культурально-независимые]; B --- B1[Бактериологический]; B --- B2[Микологический]; B --- B3[Вирусологический]; C --- C1[Автоматический бактериологический Анализатор]; C --- C2[MALDI-TOF-спектрометрия]; D --- D1[Методы амплификации нуклеиновых кислот, в том числе ПЦР]; D --- D2[ИФА (иммуноферментный анализ)];
```

Культуральный

Бактериологический
Микологический
Вирусологический

Культурально-зависимые

Автоматический
бактериологический
Анализатор

MALDI-TOF-
спектрометрия

Культурально-независимые

Методы амплификации
нуклеиновых кислот,
в том числе ПЦР

ИФА
(иммуноферментный
анализ)

Микробиологические анализаторы — это автоматизированные системы по определению присутствия/отсутствия патогенных микроорганизмов, а также видовой принадлежности и влияния на них антибиотиков. Анализ проводится из любых биологических образцов. В сравнении с классическими методами микробиологического анализа использование анализаторов, позволяет значительно сократить время получения результатов от нескольких часов до суток вместо 3-5 суток при классическом анализе.



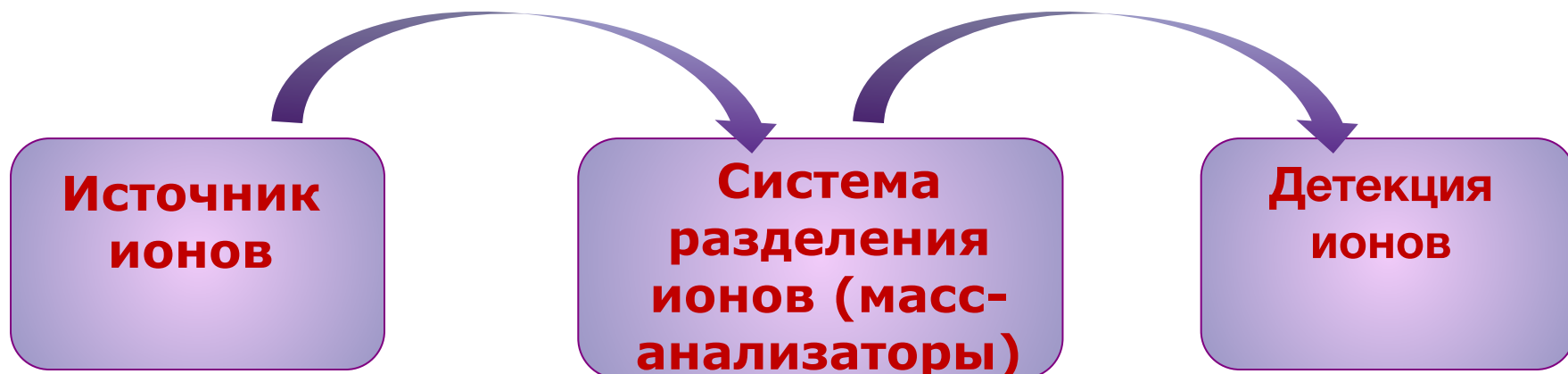
Принципы и технологии, лежащие в основе работы микробиологических анализаторов:

- непрямой метод анализа изменения импеданса;
- иммуноферментный флуоресцентный анализ (ИФА);
- измерение оптической плотности образца;
- молекулярно-генетические методы;
- флуориметрические и колориметрические методы;
- матричная времяпролетная масс-спектрометрия.

По степени автоматизации **микробиологические анализаторы** различаются на полуавтоматические и полностью автоматические.

- **Масс-спектрометрия** – аналитический метод измерения массы молекул или атомов анализируемого вещества (молекулярные весы)
идентификации молекул путем измерения отношения их массы к заряду в ионизированном состоянии.
- **Масс-спектрометр** – это инструмент, способный в условиях вакуума разделять находящиеся в газовой фазе заряженные частицы вещества согласно отношению их массы к заряду

Принцип масс-спектрометрического анализа:



MALDI-TOF-спектрометрия

- **MALDI** (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) – ионизация вещества с помощью матрицы и лазерного излучения.
- **TOF MS** (Time of Flight Mass-Spectrometry) – время пролетная масс-спектрометрия. Масса молекулы оценивается по времени пролета от источника ионизации до детектора ионов.

Идентификация микроорганизмов через прямое белковое профилирование с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии

MALDI-TOF - времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

Принцип метода.

На поверхности металлического или пластикового слайда чистая культура микроорганизмов смешивается с раствором матрицы, и при испарении растворителя образуется совместный кристалл из них.

После этого слайд помещается в прибор, в котором поддерживается вакуум.

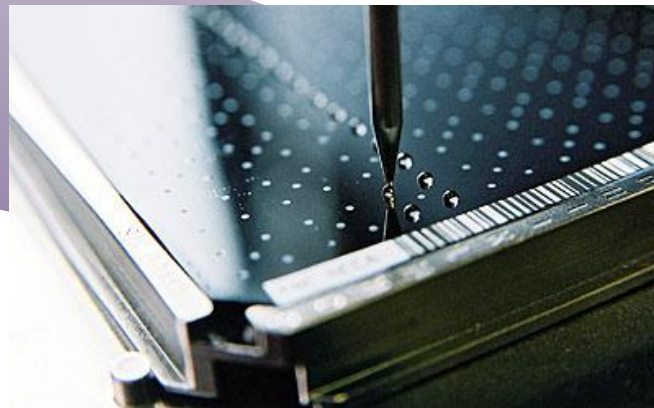
Прямое нанесение колонии на мишень,
помещение мишени в прибор

Матрица: →

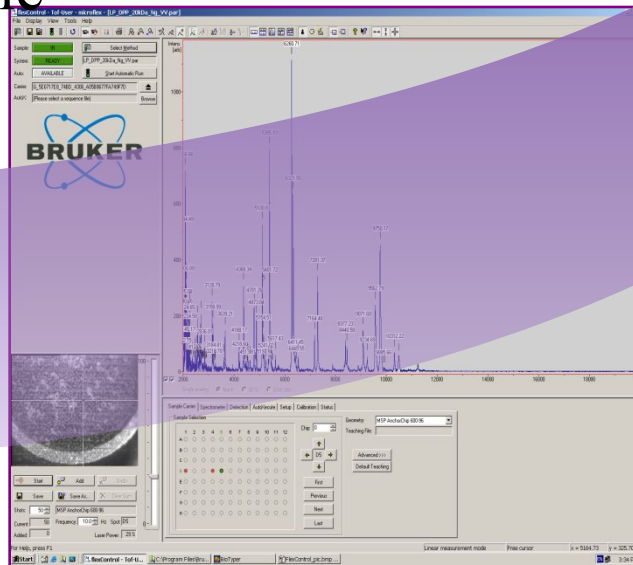


пробоподготовка

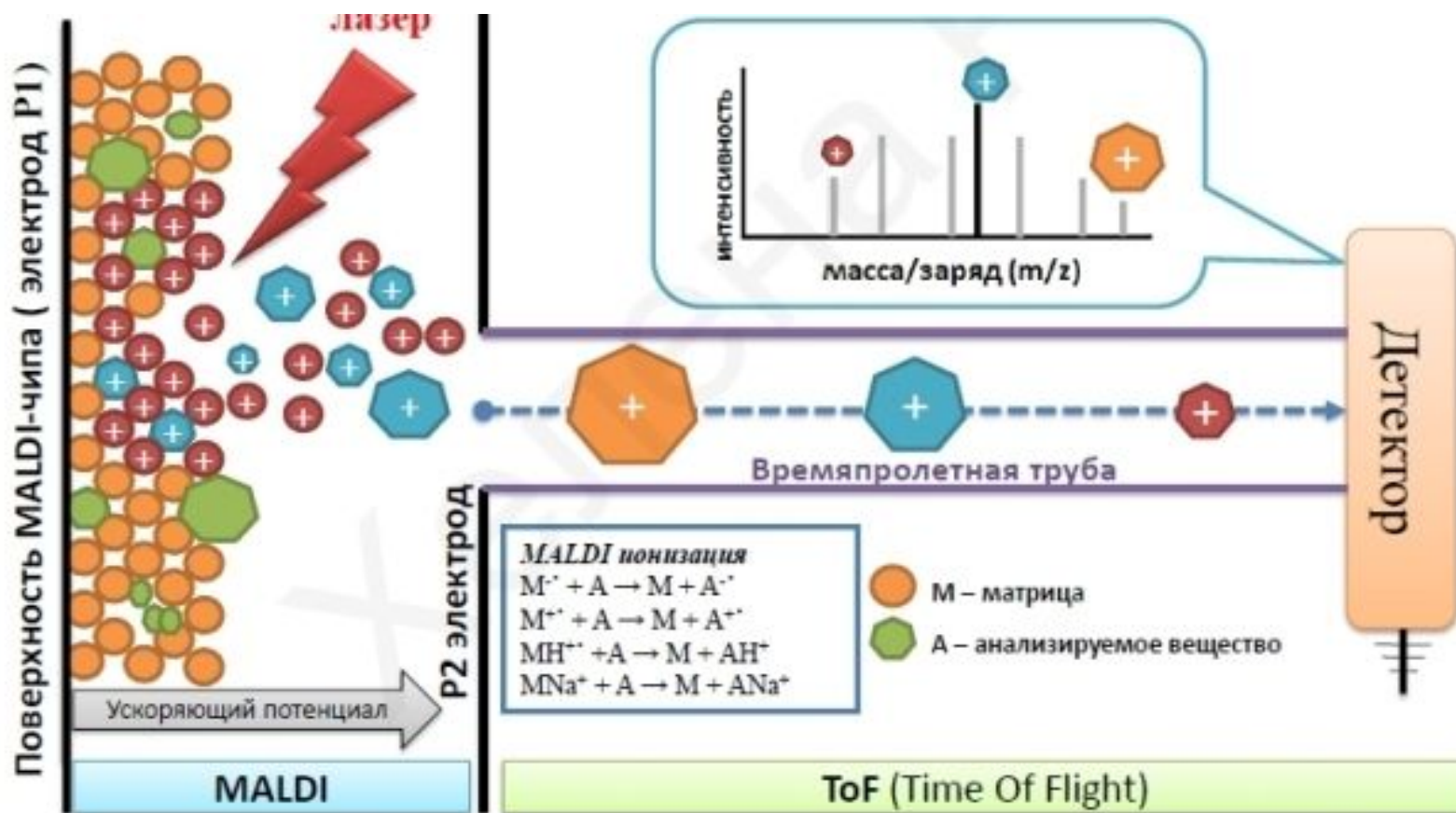
центрифугирование



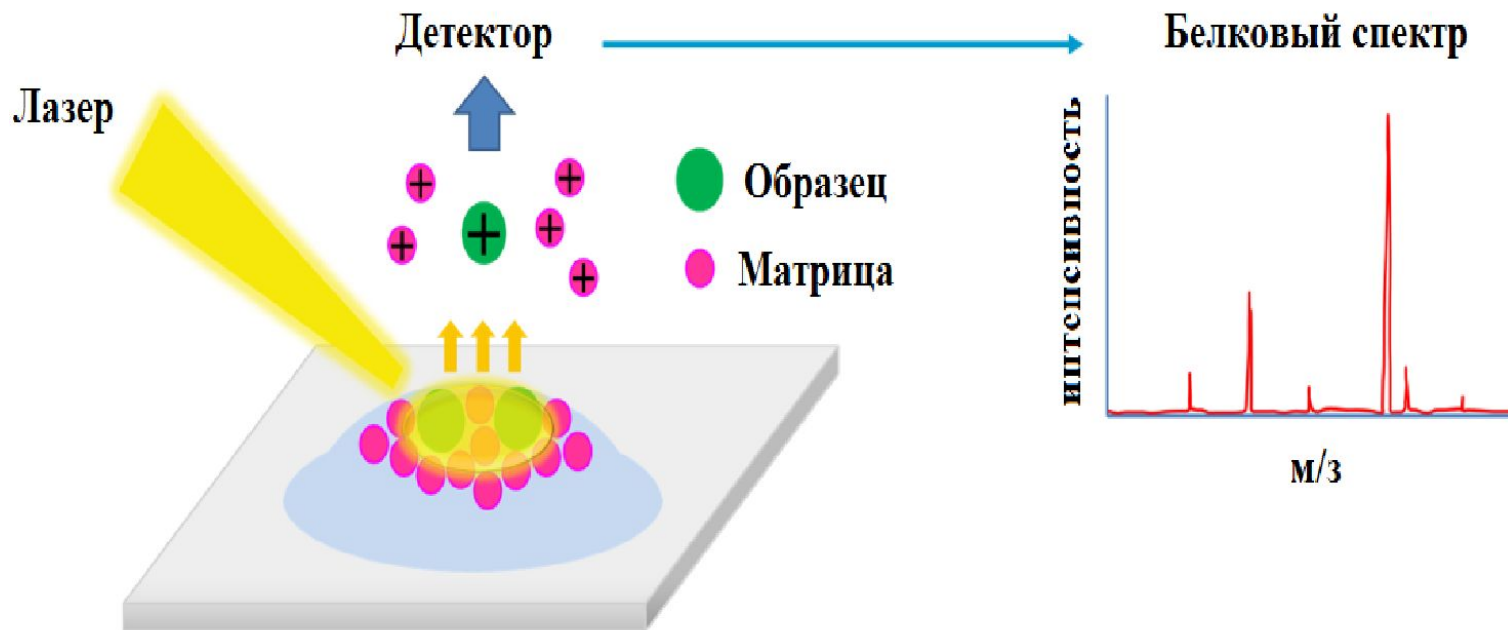
**Видовая
идентификация
микроорганизма
2-5 минут**



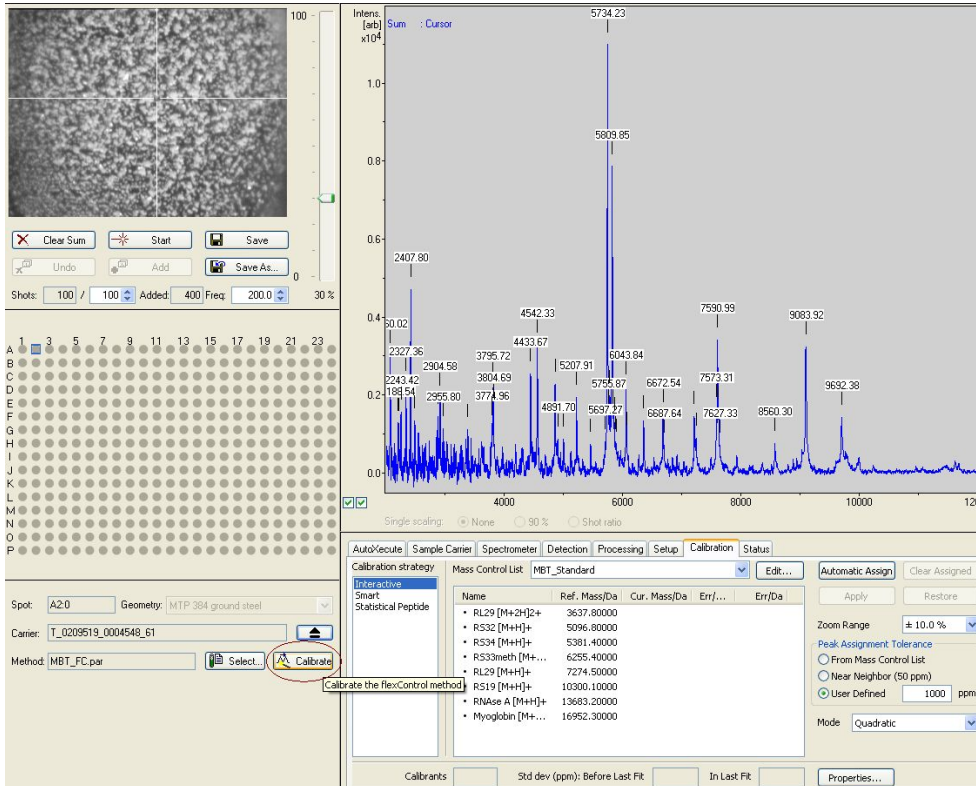
MALDI-TOF



Лазерный импульс испаряет кристаллы матрицы, в результате чего содержимое микробных клеток ионизируется и выбрасывается в рабочую область прибора. Ионизированные белки разгоняются электромагнитным полем и бьются об мишень, при этом по времени пролета до мишени определяется их массово-зарядовое соотношение. Таким образом, на выходе получается **белковый спектр**, позволяющий аппаратно-программному комплексу провести идентификацию чистой культуры.

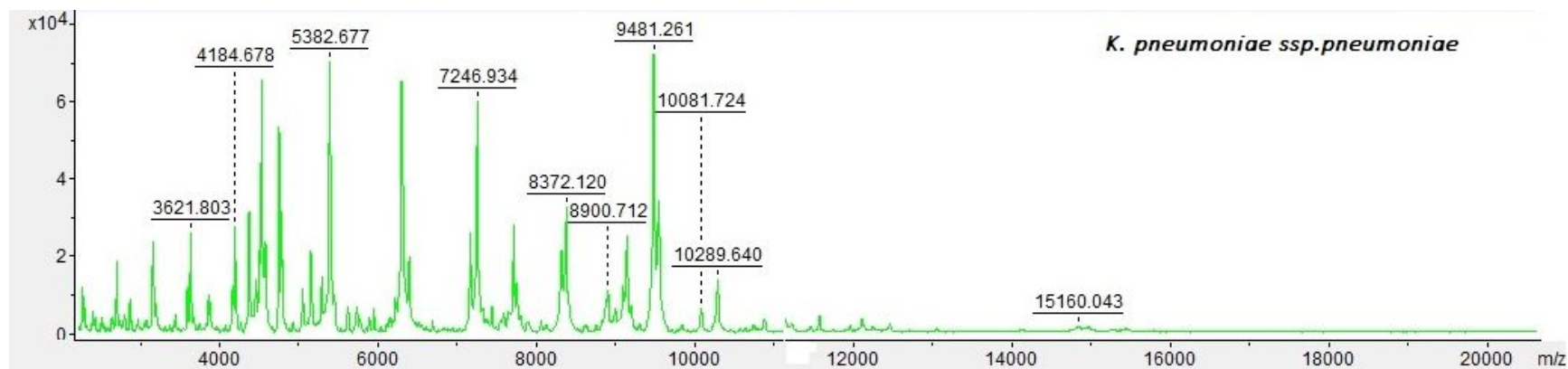


Калибровка



- Для для калибровки шкалы масс используется калибровочный стандарт
- Присвоение значения масс пикам
- Сохранение калибровки

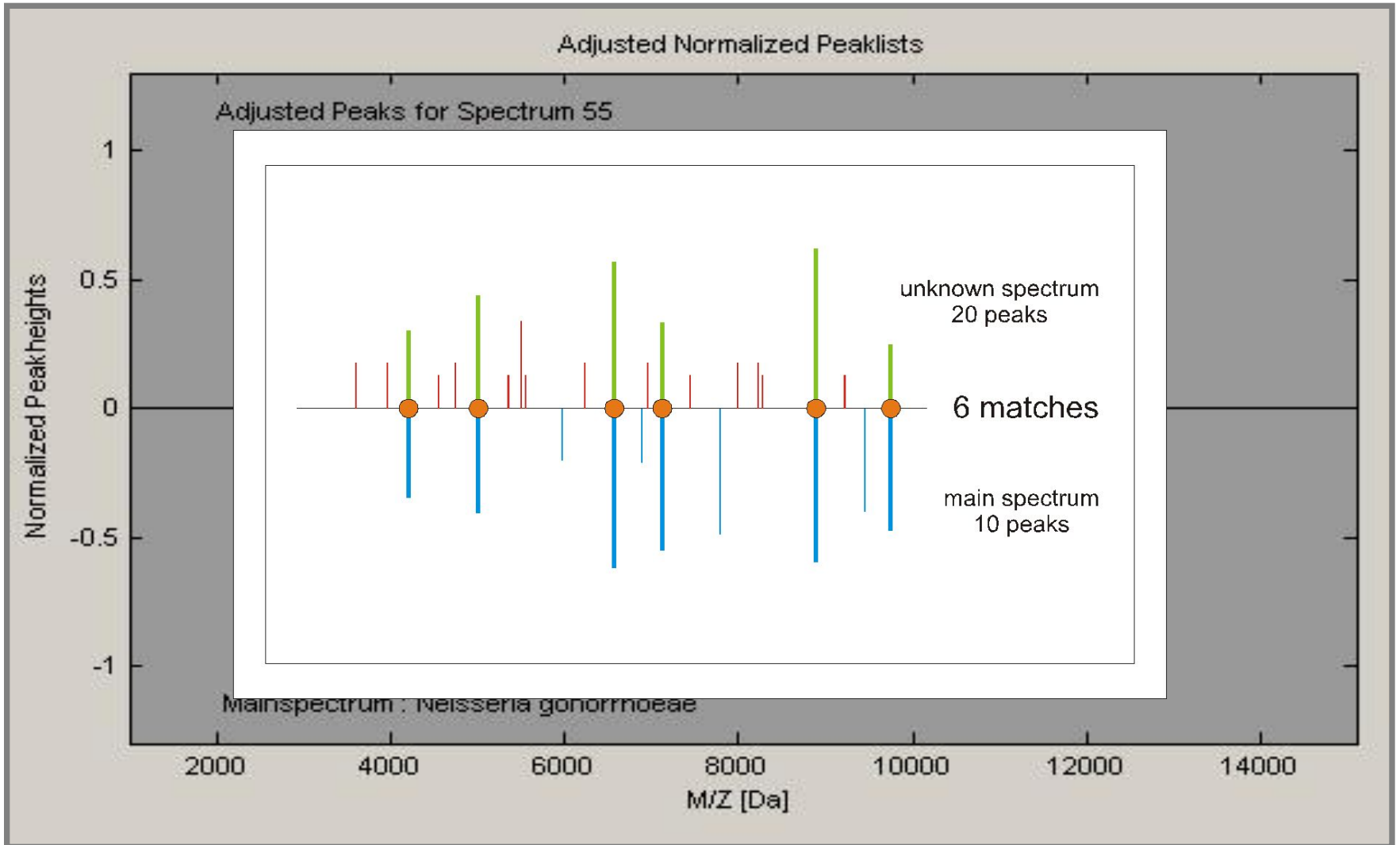
Метод выявляет уникальный набор белков исследуемых микроорганизмов – своеобразный «отпечаток пальца». Идентификация происходит, в основном, **по рибосомальным белкам**, которые встречаются во всех микроорганизмах



Пример масс-спектра, полученного при идентификации *Klebsiella ssp. pneumoniae*.

Идентификация микроорганизмов до вида при **MALDI-TOF масс-спектрометрии** проводится путём **сопоставления** получаемых масс-спектров белков **с базой данных**, заложенной в программу анализатора (масс-спектрометра).

Визуальное сравнение масс-спектров исследуемой культуры (вверху) и референс-штамма (внизу)



Автоматический анализ результатов


Mainspectrum Classification Results - Microsoft Internet Explorer

File Edit View Favorites Tools Help

Back Forward Stop Home Search Favorites Refresh Print Mail Stop

Address <http://hbclinprotdb1.bdal.de/BioTyper/My%20Project%20312.html> Go Links

Classification Results



Project Info

Project Name: **My Project 312**
Project Description: contains very urgent data
Project Owner: kraeuter
Project Creation Date/Time: 2007-02-23 13:12:35.203
Project Analyte Count: 12

Analyte 1

Analyte Name: **A1**
Analyte Description: measured at A1
Analyte ID: XY00001-1
Analyte Creation Date/Time: 2007-02-23 13:17:56.484

Match	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1	Acidiphilium acidophilum B349_UFL	2.527	76588
2	Pseudomonas lundensis DSM 6252T HAM	0.626	86185
3	Nocardia sp MB_9090_05 THL	0.408	1817
4	Enterococcus cloacae (PX) 22086116 I_MLD	0.407	550
5	Pseudomonas jessenii CIP 105274 HAM	0.383	77298
6	Escherichia coli ATCC 25922 THL	0.369	562
7	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 9295_1 CHB	0.358	72407
8	Pseudomonas abietaniphila CIP 106708 HAM	0.31	89065
9	Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi LMG 5011 HAM	0.306	29438
10	Pseudomonas rhodesiae DSM 14020T HAM	0.251	76760

Done Trusted sites

MALDI-TOF масс-спектрометрия

Позволяет идентифицировать

-бактерии

-микросцицеты (грибы)

-вирусы