**Лекция № 14**

**Тема: Методы микробиологической диагностики бактериальных инфекций.**

**План лекции:**

1. **Микроскопическое и бактериологическое исследования,**
2. **Серологическое исследование (реакции агглютинации, преципитации, лизиса, связывания комплемента, с использованием метки, нейтрализации токсина);**
3. **Аллергические диагностические пробы (кожные, in vitro);**
4. **Молекулярно-биологические методы (полимеразная цепная реакция, секвенирование ДНК, гибридизация нуклеиновых кислот).**

**Основные понятия:** микроскопические методы, бактериологический метод, серологические исследования

**Тип занятия:**

**Место проведения:** кабинет микробиологии

**Время:** 90 минут, 2 академических часа

**Оснащение:** ЭОР, рабочая тетрадь для студентов, задачи, тесты, курс лекций.

**Цель занятия:**формирование профессиональных навыков при диагностике бактериальных инфекций

**ОК 1-9**

**ПК 1.1 - 1.3, 2.1-2.3, 2.5, 2.6**

Первым этапом микробиологической диагностики инфекционных болезней является выбор материала для исследования, обусловленный патогенезом заболевания.

***1.Микроскопические методы*** исследований включают приготовление мазков и препаратов для микроскопирования. В большинстве случаев результаты микроскопических исследований носят ориентировочный характер (например, определяют отношение возбудителей к окраске), так как многие микроорганизмы лишены морфологических и тинкториальных особенностей. Тем не менее микроскопией материала можно определить некоторые морфологические признаки возбудителей (наличие ядер, жгутиков, внутриклеточных включений и т.д.), а также установить факт наличия или отсутствия микроорганизмов в присланных образцах.

Основным методом диагностики инфекционных заболеваний является ***бактериологический метод.*** Его применяют практически при всех бактериальных инфекциях для установления точного диагноза и нередко для назначения лечения, несмотря на продолжительность исследования от 3 до 5 дней (иногда до 2 мес). Бактериологический метод включает посев исследуемого материала на питательные среды, выделение чистой культуры и ее идентификацию. В том случае, если в исследуемом материале предполагается содержание возбудителя в достаточном количестве, посев материала производят на плотные питательные среды (для получения изолированных колоний). При незначительном содержании микроорганизмов исследуемый материал прежде всего засевают на жидкие питательные среды - среды обогащения. Идентификацию выделенной чистой культуры производят по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим, антигенным и токсигенным свойствам (в зависимости от вида возбудителя). Определение перечисленных свойств позволяет установить вид возбудителя. С эпидемиологической целью производят внутривидовую идентификацию (эпидемиологическое маркирование) выделенной культуры: определяют ее фаговар, биовар и т. д. Кроме того, для назначения рациональной химиотерапии, как правило, определяют чувствительность выделенной культуры к антибиотикам.

Выбор материала для исследования бактериоскопическим методом зависит от предполагаемой этиологии заболевания, стадии болезни с учетом ее патогенеза, биологических свойств возбудителя и других моментов.

1. При инфекционных болезнях, протекающих с бактериемией (брюшной тиф, генерализованные и септические формы сальмонеллеза); при сепсисе любой этиологии, вызываемом не только гноеродной кокковой микрофлорой, синегнойной палочкой, но и более редкими ее возбудителями (Serratia Salinaria, неферментирующие бактерии, анаэробы, L-формы стрептококка (метод Сукнева) и другие микроорганизмы), прибегая в этих случаях к посевам на специальные питательные среды. Следует подчеркнуть, что успех частоты и спектр выделяемых возбудителей из крови и других биологических секретов больного зависят от эрудиции, пытливости, настойчивости и упорства работников бактериологической лаборатории.

2. Спинномозговая жидкость (гнойные менингиты; туберкулезный менингит при длительном выращивании (более месяца) на специальных для выделения туберкулезных бактерий питательных средах.

3. Мокрота (острые пневмонии и трахеобронхиты, туберкулез, коклюш, чума, редкие формы брюшного тифа (пневмотиф), легионеллез, респираторный микоплазмоз и хламидиозы).

4. Слизь, гной с миндалин (стрептококковые и стафилокковые ангины).

5. Налет и слизь с миндалин, из зева и носа, отделяемое с конъюнктивы, половых органов (дифтерия).

6. Соскоб со слизистой носа (проказа).

7. Отделяемое из носа и ротоглотки (синуиты, озена, риносклерома).

8. Отечная жидкость, кусочки пораженных мышц, некрозированные ткани (анаэробные инфекции); отделяемое ран (ботулизм; в случае необходимости и столбняк).

9. Пунктат из увеличенных лимфоузлов (туберкулез, токсоплазмоз).

10. Содержимое карбункула и пунктат из нагноившихся лимфоузлов (чума, туляремия, септикопиемия, сибирская язва).

***2.Серологические исследования*** внедрены в клинику несколько позднее бактериологического метода, предложенного Р. Кохом. В 1896 г. Ф. Видаль обнаружил, что сыворотки крови больных брюшным тифом к концу 1-й недели болезни приобретают способность агглютинировать брюшнотифозную палочку - возбудителя брюшного тифа (положительная реакция Видаля). При полимикробной этиологии инфекционных болезней после открытия Видаля стали также прибегать к определению титров сывороточных агглютининов к выделяемым из патологического материала нескольким видам бактерий (реакция аутовидаля) и контролировать их динамику в зависимости от стадии болезни. Наиболее высокие титры агглютининов к одному из видов выделенных бактерий свидетельствуют в пользу его большей этиологической причастности к развитию болезни.

Уже в начале применения реакции Видаля в клинике было замечено, что самые тяжелые формы, например, брюшного тифа могут протекать при отсутствии в крови агглютининов (отрицательная реакции Видаля), что указывает на относительную диагностическую ценность этого метода как при брюшном тифе, так и при других инфекционных болезней. Позднее он был заменен более чувствительными серологическими методами. Но приоритетное значение открытия Видаля останется навсегда.

В настоящее время для серологической диагностики бактериальных инфекций применяют более чувствительные методы, когда антиген бактерий сорбируют на поверхности эритроцитов (эритроцитарные диагностикумы1). Таким образом, были разработаны принципиально новые серологические реакции: *прямой (РПГА) 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). Используется для определения брюшного тифа, паратифа.

*Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА*) основана на использовании эритроцитов с адсорбированными на их поверхности антигенами, взаимодействие которых с соответствующими антителами сыворотки крови больных приводит к образованию фестончатого осадка. Используется для определения беременности, выявления повышенной чувствительности больных к лекарственным препаратам и гормонам;

*Реакции преципитации.* Реакции преципитации – реакции, в которых про-исходит 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. Диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации антигена. Наибольшее распространение получила реакция преципитации в полужидком геле агара (двойная иммуно-иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез и др.). Реакцию используют для определения содержания в крови иммуноглобулинов различных классов, компонентов системы комплемента.

*Реакция нейтрализации.* Реакция нейтрализации основана на способности антител иммунной сыворотки нейтрализовать повреждающее действие микроор-ганизмов 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 ос-нованы 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). Применяется для диагностики инфекционных болезней, в частности, сифилиса.

*Реакция с использованием меченых антител или антигенов*. Реакция основана на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками, меченными флюорохромами, способны светиться в ультрафиоле-товых лучах люминисцентного микроскопа (реакция иммунофлюоресценции)..

*Реакция лизиса.* Сущность реакции состоит в том, что при взаимодействии специфических антител с антигенами клеток (эритроцитов, бактерий), на их по-верхности образуется комплекс, который активирует комплемент по классическому пути, вследствие этого происходит лизис этих клеток. Эта реакция используется при типировании антигенов системы HLA на лимфоцитах. К типируемым лимфоцитам добавляют антисыворотки против различных HLA-антигенов, затем их отмывают и добавляют комплемент. Присутствие соответствующего антигена приводит к лизису лимфоцитов.

***3.Аллергический метод*** направлен на выявление повышенной чувствительности организма к специфическому аллергену, которым является возбудитель заболевания. Примером того метода является постановка кожно-аллергических проб. В основе метода лежит феномен гиперчувствительности замедленного типа.

*4.Применяют также молекулярно-генетические методы диагностики: ПЦР, гибридизация ДНК и др.*

Полимеразная цепная реакция позволяет обнаружить микроб в исследуемом материале (воде, продуктах, материале от больного) по наличию в нем ДНК микроба без выделения последнего в чистую культуру.

Для проведения этой реакции из исследуемого материала выделяют ДНК, в которой определяют наличие специфичного для данного микроба гена. Обнаружение гена осуществляют его накоплением. Для этого необходимо иметь праймеры комплементарного 3'-концам ДНК исходного гена. Накопление (амплификация) гена выполняется следующим образом. Выделенную из исследуемого материала ДНК нагревают. При этом ДНК распадается на 2 нити. Добавляют праймеры. Смесь ДНК и праймеров охлаждают. При этом праймеры, при наличии в смеси ДНК искомого гена, связываются с его комплементарными участками. Затем к смеси ДНК и праймера добавляют ДНК-полимеразу и нуклеотиды. Устанавливают температуру, оптимальную для функционирования ДНК-полимеразы. В этих условиях, в случае комплементарности ДНК гена и праймера, происходит присоединение нуклеотидов к З'-концам праймеров, в результате чего синтезируются две копии гена. После этого цикл повторяется снова, при этом количество ДНК гена будет увеличиваться каждый раз вдвое. Проводят реакцию в специальных приборах – амплификаторах. ПЦР применяется для диагностики вирусных и бактериальных инфекций.

Рестрикционный анализ. Данный метод основан на применении ферментов, носящих название рестриктаз. Рестриктазы представляют собой эндонуклеазы, которые расщепляют молекулы ДНК, разрывая фосфатные связи не в произвольных местах, а в определенных последовательностях нуклеотидов. Особое значение для методов молекулярной генетики имеют рестриктазы, которые узнают последовательности, обладающие центральной симметрией и считывающиеся одинаково в обе стороны от оси симметрии. Точка разрыва ДНК может или совпадать с осью симметрии, или быть сдвинута относительно нее.

В настоящее время из различных бактерий выделено и очищено более 175 различных рестриктаз, для которых известны сайты (участки) узнавания (рестрикции). Выявлено более 80 различных типов сайтов, в которых может происходить разрыв двойной спирали ДНК.

В геноме конкретной таксономической единицы находится строго определенное (генетически задетерминированное) число участков узнавания для определенной рестриктазы.

Если выделенную из конкретного микроба ДНК обработать определенной рестриктазой, то это приведет к образованию строго определенного количества фрагментов ДНК фиксированного размера.

Размер каждого типа фрагментов можно узнать с помощью электрофореза в агарозном геле: мелкие фрагменты перемещаются в геле быстрее, чем более крупные фрагменты, и длина их пробега больше. Гель окрашивают бромистым этидием и фотографируют в УФ-излучении. Таким образом, можно получить рестрикционную карту определенного вида микробов.

Сопоставляя карты рестрикции ДНК, выделенных из различных штаммов, можно определить их генетическое родство, выявить принадлежность к определенному виду или роду, а также обнаружить участки, подвергнутые мутациям.

Этот метод используется также как начальный этап метода определения последовательности нуклеотидных пар (секвенирования) и метода молекулярной гибридизации.

Метод молекулярной гибридизации позволяет выявить степень сходства различных ДНК. Применяется при идентификации микробов для определения их точного таксономического положения.

Метод основан на способности двухцепочечной ДНК при повышенной температуре (90 °С) в щелочной среде денатурировать, т. е. расплетаться на две нити, а при понижении температуры на 10 °С вновь восстанавливать исходную двухцепочечную структуру. Метод требует наличия молекулярного зонда.

Зондом называется одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, меченная радиоактивными нуклидами, с которой сравнивают исследуемую ДНК.

Для проведения молекулярной гибридизации исследуемую ДНК расплетают указанным выше способом, одну нить фиксируют на специальном фильтре, который затем помещают в раствор, содержащий радиоактивный зонд. Создаются условия, благоприятные для образования двойных спиралей. В случае наличия комплементарности между зондом и исследуемой ДНК, они образуют между собой двойную спираль.

Риботипирование и опосредованная транскрипцией амплификация рибосомальной РНК. Последовательность нуклеотидных оснований в оперонах, кодирующих рРНК, отличается консервативностью, присущей каждому виду бактерий. Эти опероны представлены на бактериальной хромосоме в нескольких копиях. Фрагменты ДНК, полученные после обработки ее рестриктазами, содержат последовательности генов рРНК, которые могут быть обнаружены методом молекулярной гибридизации с меченой рРНК соответствующего виды бактерий. Количество и локализация копий оперонов рРНК и рестрикционный состав сайтов как внутри рРНК-оперона, так и по его флангам варьируют у различных вида бактерий. На основе этого свойства построен метод риботипирования, который позволяет производить мониторинг выделенных штаммов и определение их вида. В настоящее время риботипирование проводится в автоматическом режиме в специальных приборах.

Опосредованная транскрипцией амплификация рРНК используется для диагностики смешанных инфекций. Этот метод основан на обнаружении с помощью молекулярной гибридизации амплифицированных рРНК, специфичных для определенного вида бактерий. Исследование проводится в три этапа:

1. Амплификация пула рРНК на матрице, выделенной из исследуемого материала ДНК при помощи ДНК-зависимой РНК-полимеразы.

2. Гибридизация накопленного пула рРНК с комплементарными видоспецифическим рРНК олигонуклеотидами, меченными флюорохромом или ферментами.

3. Определение продуктов гибридизации методами денситометрии, иммуноферментного анализа (ИФА).

Реакция проводится в автоматическом режиме в установках, в которых одномоментное определение рРНК, принадлежащих различным видам бактерий, достигается разделением амплифицированного пула рРНК на несколько проб, в которые вносятся комплементарные видоспецифическим рРНК меченые олигонуклеотиды для гибридизации.

**Основные источники:**

1. Быков А.С. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. [Текст] Атлас-руководство. Медицинское информационное агентство, (МИА) 2018- 416с. ISBN 978-5-9986-0307-5 2.

Зверев В.В., Бойченко М.Н. Основы микробиологии и иммунологии [Текст]. Учебник для медицинских училищ и колледжей. - М: ГЭОТАРМедиа. 2016 - 368. ISBN: 9785970435991 3.

Камышева К.С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. [Текст]. - Ростов-на-Дону: Феникс, 2018 – 381с. ISBN:978-5-222-28899-3 4. Карапац М.М, Сбойчаков В.Б. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии [Текст]. - М: Кнорус, 2017 – 274 с.ISBN: 978-5-406-05651-6 5. Основы микробиологии и иммунологии [Электронный ресурс] : учебник / Под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. - http://www.medcollegelib.ru/book/ISBN9785970435991.html 14

**Интернет ресурсы:**

1. Министерство здравоохранения РФ [Электронный ресурс] http://www.rosminzdrav.ru – официальный сайт.

2. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс] http://www.who.int/ru/– официальный сайт