

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.ОД.4.3 Современные методы исследования в микробиологии

Направление подготовки (специальность) 36.06.01 Ветеринария и зоотехния
(уровень подготовки кадров высшей квалификации по программе подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре)

Профиль подготовки (специализация) 06.02.02 Ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций.....	3
1.1 Лекция № 1 Метод полимеразной цепной реакции и его применение в биологии...	3
1.2 Лекция № 2 Гибридизация ДНК.....	6
1.3 Лекция № 3 Секвенирование.....	8
1.4 Лекция № 4 Иммунологические методы исследования	12
1.5 Лекция № 5 Методы определения персистентных характеристик микроорганизмов	18
2. Методические указания по проведению лабораторных работ.....	25
2.1 Лабораторная работа № ЛР-1 Устройство микробиологической лаборатории.....	25
2.2 Лабораторная работа № ЛР -2 Методы стерилизации	27
2.3 Лабораторная работа № ЛР -3 Простая и сложная окраска микропрепаратов из чистой культуры	29
2.4 Лабораторная работа № ЛР -4 Экспериментальное заражение лабораторных животных. Правила вскрытия и бактериологического исследования трупов лабораторных животных	31
2.5 Лабораторная работа № ЛР -5 Этапы постановки ПЦР. Учет результатов.....	35
2.6 Лабораторная работа № ЛР -6 Иммуноферментный анализ (ИФА).....	40
2.7 Лабораторная работа № ЛР -7 Метод флуоресцирующих антител (МФА).....	42
2.8 Лабораторная работа № ЛР -8 Методы исследования персистентных характеристик микроорганизмов	44
2.9 Лабораторная работа № ЛР-9 Методы количественного определения факторов вирулентности микроорганизмов.....	52

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1 Лекция №1 (2 часа).

Тема: «Метод полимеразной цепной реакции и его применение в биологии»

1.1.1 Вопросы лекции:

1. История открытия ПЦР. Сущность метода.
2. Этапы полимеразной цепной реакции.
3. Применение в микробиологии.

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. История открытия ПЦР. Сущность метода.

XXI век можно без преувеличения назвать веком молекулярной биологии и биотехнологии, поскольку накоплен достаточный объем знаний о строении биологических систем не только на макро-, но и на микроуровне. Эти знания представляют ценность прежде всего в аспекте их практического применения. Знания о НК как универсальном носителе наследственной информации всех клеточных организмов (бактерий, грибов, растений, животных и человека), о ее структуре и функционировании способствовали появлению совершенно новых направлений современной биологической науки, имеющих прикладное значение.

Идея полимеразной цепной реакции осенила изобретателя мгновенно и, как кажется, абсолютно непредсказуемо. Но это только на первый взгляд, поскольку мы помним слова отца микробиологии Л.Пастера, которому принадлежит известная фраза - Удача одаривает только подготовленные умы. Весной поздним вечером вместе с подругой Кэри Мюллис, 39-летний химик-синтетик из калифорнийской биотехнологической фирмы Cetus, ехал в автомобиле в свой загородный дом, когда он догадался о возможности многократного увеличения числа копий участков ДНК в пробирке в процессе реакции, главной особенностью которой являются повторяющиеся температурные циклы, за что, спустя 9 лет, получил Нобелевскую премию по химии. Метод ПЦР назван "изобретением века", поскольку он не только ускорил реализацию программы "Геном человека", но, прежде всего, способствовал повышению эффективности клинической диагностики многих заболеваний человека и животных.

В основе метода ПЦР лежит природный процесс - комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция называется репликация ДНК.

2. Этапы полимеразной цепной реакции.

Естественная репликация ДНК включает в себя несколько стадий:

- 1) Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК).
- 2) Инициация - образование коротких двухцепочечных участков ДНК (затравок, необходимых для инициации синтеза ДНК).
- 3) Элонгация - синтез новой цепи ДНК (комплементарное достраивание обеих нитей).

ПЦР имитирует естественный процесс репликации (размножения) ДНК *in vitro*, в результате чего, в течение нескольких часов из одного фрагмента молекулы ДНК можно получить более 50 млрд. идентичных молекул. Помним, что репликация ДНК может начаться не в любой точке, а только в определенных стартовых блоках - коротких двунитевых участках.

Суть метода заключается в том, что маркировав такими блоками специфический только для данного вида организма (но не для других видов) участок ДНК, можно многократно воспроизвести именно этот участок.

Для того чтобы осуществить такой процесс в пробирке, используют две генетические пробы, называемые праймерами, которые и служат в качестве затравки для синтеза выбранного участка ДНК. При внесении в исследуемую пробу праймеры

«прочесывают» раствор в поисках участка, которому они комплементарны и, следовательно, способны присоединиться, образовав двунитчатый стартовый участок.

После присоединения праймеров начинается воспроизведение с помощью фермента полимеразы специфического фрагмента ДНК. Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле - это и есть цепная реакция в ПЦР. В результате количество копий фрагмента увеличивается в геометрической прогрессии и в течение 30-40 циклов нарабатывается количество ДНК, достаточное, чтобы визуально учитывать результаты реакции.

Полимеразная цепная реакция – искусственный процесс многократного копирования (амплификации) специфического фрагмента ДНК, осуществляемый *in vitro*.

Открытие возможности избирательной наработки определённых участков ДНК с помощью ПЦР, произвело, по существу, революционный переворот во взглядах исследователей, и было взято на вооружение представителями различных дисциплин.

Схема ПЦР-диагностики включает следующие этапы:

1. Пробоподготовка (выделение нуклеиновой кислоты).
2. Собственно ПЦР.
3. Детекция продуктов амплификации.

1 этап. Пробоподготовка или выделение ДНК (РНК). Проба подвергается специальной обработке, в результате которой происходит лизис клеточного материала, удаление белковых и полисахаридных фракций, и получение раствора ДНК или РНК. В процессе выделения нуклеиновой кислоты необходимо предотвратить влияние ингибиторов ПЦР, сконцентрировать нуклеиновую кислоту в объеме, соответствующем формату ПЦР, и предотвратить действие ДНКаз и РНКаз. В качестве исходной матрицы для ПЦР может быть использована ДНК, выделенная как из свежеполученных клеток и тканей, так и из замороженных, высушенных или фиксированных препаратов, имеющих частично деградированные нуклеиновые кислоты, т. е. объекты, ранее недоступные для анализа. Так, с помощью ПЦР была амплифицирована, клонирована и секвенирована ДНК египетской мумии, именно с помощью метода ПЦР были идентифицированы останки семьи Романовых.

2 этап. Собственно ПЦР или амплификация (*amplification* — *англ. умножение, усиление*). Для её проведения необходимы следующие компоненты:

ДНК-матрица (ДНК или ее часть, содержащая искомый специфический фрагмент).

Праймеры – это химически синтезированные олигонуклеотидной природы затравки для ПЦР, определяющие границы (фланкирующие) амплифицируемого участка ДНК-матрицы и комплементарные противоположным её цепям.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) (дАТФ, дТТФ, дГТФ и дЦТФ) в реакционной смеси содержатся в эквивалентных концентрациях, так как избыток какого-либо из них увеличивает ложное спаривание нуклеотидов в ПЦР.

Фермент Таq-полимераза (термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путем последовательного присоединения нуклеотидных оснований к растущей цепи синтезируемой ДНК). Таq-полимераза была выделена у микроорганизмов, обитающих в гейзерах - *Thermus aquaticus*.

Магний необходим для функционирования фермента Таq-ДНК-полимеразы.

Буфер должен обеспечивать оптимальные условия для работы фермента. Наиболее распространен трис-НС1-буфер, который удерживает pH во время ПЦР между 6,8 и 7,8, содержит желатин или бычий сывороточный альбумин и неионные детергенты для стабилизации фермента.

Минеральное масло наслаивается на поверхность реакционной смеси для предотвращения испарения в процессе ПЦР.

Амплификация состоит из повторяющихся циклов, которые делятся на этапы. Каждый этап протекает при определённом температурном режиме, который разработчики

подбирают опытным путём, поэтому значения температур для конкретного этапа могут варьировать в достаточно широком диапазоне.

I этап: Денатурация ДНК (плавление), когда рвутся водородные связи и получается две ниточки. Осуществляется при температуре 93° - 95°C в течение 30-40 сек.

II этап: Отжиг праймеров, т.е. их присоединение. Осуществляется при температуре 50° - 65°C . Праймеры комплементарны последовательности ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи протекает только между ними.

К подбору праймеров предъявляют определённые требования:

1. Они должны быть комплементарны определённому участку ДНК и не должны быть комплементарны друг другу.

2. Чтобы исключить отрицательный результат, в случае появления мутации, праймеры для ПЦР-детекции инфекционных возбудителей создают на консервативных участках их ДНК, которые редко подвергаются генетическим перестройкам. Поиски таких участков осуществляют при помощи специальных компьютерных программ.

3. Праймер должен иметь длину 20—30 нуклеотидов. Чем больше нуклеотидов в праймере, тем специфичнее ПЦР, поскольку короткие праймеры часто «ошибаются».

4. Используемые праймеры должны быть сбалансированы по температуре отжига.

III этап: Достраивание цепей ДНК или элонгация. Комплементарное достраивание 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 (Taq-полимеразой) и проходит при температуре $70-72^{\circ}\text{C}$. Время протекания синтеза - 20-40 сек.

Три вышеописанных фазы: 1) денатурация ДНК (плавление); 2) комплементарное связывание праймера с ДНК-матрицей (отжиг); 3) синтез ДНК с помощью ДНК-полимеразы (достройка праймера) и составляют суть каждого цикла ПЦР.

Далее этот стандартный цикл ПЦР — плавление, отжиг, синтез — воспроизводится многократно, количество амплификонов растёт в геометрической прогрессии, поскольку 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.

Поэтому, 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.

Однако кинетика ПЦР имеет экспоненциальный характер только на начальном этапе (20—25 циклов), после чего начинается выход на плато (после 40—45 циклов) в силу

1. истощения дезоксинуклеозидтрифосфатов,
2. истощения праймеров
2. нарастающего температурного повреждения Taq- полимеразы,
3. конкуренции за фермент амплификонов, когда их число начнет превышать число молекул Taq-ДНК-полимеразы.

Детекция продуктов амплификации осуществляется несколькими способами. Это детекция с помощью химических (иммунохимических) реакций, детекция с помощью флюоресценции (при этом могут использоваться различные модификации праймеров), однако до настоящего времени самым простым, доступным и недорогим методом является **электрофорез**. До проведения электрофоретического разделения, к амплификационной смеси или в агарозный гель 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. Под действием электрического поля молекулы ДНК движутся от отрицательного полюса к положительному. После просматривания геля в ультрафиолетовом свете можно говорить о результатах ПЦР (в случае успешного прохождения реакции на геле видны светящиеся полосы).

В качестве альтернативы электрофоретическому методу детекции, имеющему некоторые недостатки: субъективность чтения результатов, ограничения по определению ДНК различных микроорганизмов в одной реакции, могут быть предложены **гибридизационные схемы детекции**. В этих схемах образующийся в результате амплификации фрагмент ДНК можно пометить флуоресцентным красителем, присоединяя его к 5'-концу каждого праймера. В качестве красителей часто используют флуоресцеин и родамин, которые испускают зеленый и красный свет, соответственно.

После ПЦР-амплификации ДНК-мишени проводят разделение флуоресцеин-меченного праймера и продуктов амплификации, затем регистрируют включение метки. Если ДНК-мишень в образце отсутствует, то не будет образовываться и флуоресцирующий продукт. Регистрация таких комплексов может быть проведена колориметрически или флуориметрически.

Таким образом, в процессе реакции происходит многократное избирательное копирование определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом идёт копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

3. Применение в микробиологии.

Амплификация фрагментов ДНК известной специфичности: диагностика инфекционных болезней, определение генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности у микроорганизмов.

Амплификация фрагментов ДНК с разным уровнем специфичности: изучение биоразнообразия, составление филогенетических древ.

1.2 Лекция №2 (2 часа).

Тема: «Гибридизация ДНК»

1.2.1 Вопросы лекции:

1. История открытия
2. Особенности гибридизации
3. Методы гибридизации ДНК
4. Эксперименты

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. История открытия

Молекулярная гибридизация ДНК как метод появилась в далеком 1964 г., благодаря опытам таких впоследствии известных ученых, как: Э. Болтон, Б. Хойер и Б. Маккарти. Данное открытие ознаменовало, без преувеличения, качественно новый этап разработок по эволюции геномов, и прогресс в области геносистематики. Основой принципа является обратимость реакции денатурации ДНК. По основным чертам кажется, что особо сложного здесь ничего нет. Так называемая «двойная спираль», то есть ее

вторичная структура, имеет свойство к разрушению в том случае, если водородные связи подвергнуты нестабильным условиям. Последние могут создаваться за счет высоких температур или pH. Эта же структура имеет свойство к восстановлению. А для этого понадобится создание условий для более низких температур, либо снижения уровня pH ниже 11. Данный процесс дает возможность наблюдать возникновение гибридных двухцепочечных молекул, но при определенных условиях. Таким условием является смешивание денатурированной нуклеиновой кислоты. Для ее получения используют разные источники. Ученым наперед не известны последовательности, которыми обладают нуклеотидные звенья, в том числе и в отношении тех геномов, которые сопоставляются. Но степень их близости друг к другу они вполне могут оценить. Таким образом, гибридизация ДНК очень ценна для тех разработок, которые касаются эволюционных процессов. Ни один иной метод не может дать настолько полную информацию о степени генетической близости. К тому же, здесь полностью исключена опасность конвергенции.

2. Особенности гибридизации

В числе операций на ДНК-чипах, гибридизация, наверное, самый важный этап. Успех исследования в целом будет зависеть от двух особенностей данной операции – ее эффективности и специфичности. Дело в том, что гибридизация является очень трудным процессом, особенно, если говорить о ее контроле. Также на сегодня слабо разрешенными остаются вопросы общей оптимизации данного метода. Труднее всего добиться повышения ее специфичности. Недостаточность специфичности гибридизации и сыграла главную роль в провале тех попыток, которые совершались с целью проделать секвенирование неограниченно длинных последовательностей. Для этого эксперимента были созданы чипы; здесь использовался анализ паттерна сигналов. В наше время нередко говорят о том, что это исследование наиболее привлекательное в данной области. Но добиться результата пока не удалось. Отметим, что процесс создания чипов ДНК относится к тем технологиям, которые в мире современных биотехнологических достижений считают очень сложными и не менее запутанными. С другой стороны, в области молекулярно-генетических опытов данная технология является весьма типичной. Кстати, отличительной чертой технологии с чипами ДНК считают их технологическую простоту. Поэтому осуществлять данный опыт можно практически беспрепятственно. Ограничения создаются, как правило, только теоретическими наработками, которыми пестрит процесс создания новых биотехнологических исследований. Иными словами, ограничения являются интеллектуальными, но отнюдь не техническими. Фактически на сегодня проделывать секвенирование (по схеме *denovo*) не представляется возможным. Пока специфичность гибридизации будет оставаться недостаточной, вопрос будет открытым. Более того, такая ситуация создает условия, при которых мутационный анализ отличается очень низкой эффективностью. В результате данный опыт, использующий чипы, остается малопривлекательным. Ведь секвенирование по обычной схеме практически по всем статьям является более надежной практикой.

3. Методы гибридизации ДНК

В целом речь идет о смешивании одноцепочечных его фрагментов. Для их получения стоит использовать два разные виды. Чтобы определить между конкретными видами степень их генетического родства, необходимо уяснить долю общей нуклеиновой кислоты в смеси. После воссоединения общей ДНК образуются двухцепочечные спирали. Здесь главный показатель – скорость их воссоединения. Методы и практики гибридизации на сегодняшний день пребывают в эпицентре исследований. Результаты бывают разные.

Например, в среде молекулярных химиков бытует мнение о том, что сложность процесса спаривания одноцепочной ДНК по схеме *invitro*, не в последнюю очередь из-за влияния самых разных условий, говорит об общей ненадежности метода в целом. Его сравнивают с лакмусовой пробой. Ведь результаты на самом деле очень разные, и определяются теми конкретными условиями, при которых метод применяется. Где же используется данный метод? В первую очередь им заинтересованы зоологи и ботаники, но, кроме них, также и ученые иных направлений. Нельзя не отметить ту особенность, что и ботаники, и зоологи – не специалисты по химии. Бывает, что результаты их экспериментов не отличаются надежностью. Сегодня все чаще говорят о том, что в ближайшем будущем придется прибегнуть к более строгой стандартизации методов гибридизации ДНК. Потому, те опыты, которые были наиболее ранними, будут очевидно проделывать и скрупулезно проверять.

4. Эксперименты

Ученые активно используют гибридизацию ДНК. Эта практика позволяет им проводить анализы тех молекулярных последовательностей нуклеиновых кислот, которые являются одинаковыми и/или родственными, сравнивая их. Данный эксперимент проводится таким образом, что обе нуклеиновые кислоты получают нити, имеющие образованные пары оснований, известных под названием Уотсона-Крика. Здесь важно получить данные касательно связанности информации, которой обладают две нуклеиновые кислоты. Показателем будет выступать количество комплементарности последовательностей. На сегодня известно, что и в РНК, и в ДНК вполне могут присутствовать нити, которые называют комплементарными. Определенные данные ученые получают, нагревая раствор ДНК. Когда температура превышает ту, которая является оптимальной для нуклеиновой кислоты, то можно наблюдать отделение в двойной спирали двух нитей. В науке данный температурный уровень называют температурой плавления. Если брать природную ДНК, то здесь показатель температуры плавления будет зависеть от объема G+C. Уровень температуры плавления (Т_м) не является постоянно фиксированной величиной. Данный уровень связан с условиями, которые создаются растворителями.

1.3 Лекция №3 (2 часа).

Тема: «Секвенирование»

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Секвенирование нового поколения
2. История открытия
3. Основные принципы всех методов
4. Применение секвенирования нового поколения

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Секвенирование нового поколения (англ. *next generation sequencing, NGS*) — техника определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для получения формального описания её первичной структуры. Технология методов секвенирования

нового поколения (СНП) позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования. СНП осуществляется с помощью повторяющихся циклов удлинения цепи, индуцированного полимеразой, или многократного лигирования олигонуклеотидов. В ходе СНП могут генерироваться до сотен мегабаз и гигабаз нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл.

2. История открытия

Первая концепция секвенирования была предложена Сэнгером в 1977 году. Технология получила название «метод обрыва цепи». В том же году Максам и Гилберт предложили альтернативный метод, получивший название «метод химической дегградации». Необходимость в массовом, качественном и быстром секвенировании стимулировала многочисленные модификации и всевозможные улучшения этих методов. В той или иной степени изменениям подверглись практически все составляющие этого процесса. Переломной точкой развития технологии стало появление ПЦР и автоматизация основных этапов «чтения» ДНК, давшие начало методам секвенирования следующего поколения. Платформы для методов нового поколения основываются на распараллеливании процесса «чтения» ДНК, и таким образом за один прогон работы секвенатора можно определить первичные структуры нескольких участков генома. Секвенаторы нового поколения стали значительно дешевле и гораздо эффективнее своих предшественников. На сегодняшний день производительность некоторых секвенаторов измеряется уже сотнями миллиардов пар оснований, что, например, позволяет подобным приборам сканировать индивидуальный геном человека всего за несколько дней.

3. Основные принципы всех методов

Все основные принципы работы технологий СНП базируются на секвенировании ДНК-чипов, используя интерактивные циклические ферментативные реакции с дальнейшим сбором полученной информации в виде иллюстраций. Полученные данные используются для восстановления нуклеотидной последовательности или, как для технологии SOLiD, динуклеотидных «цветов». Несмотря на разные методы получения копий (амплификация) участков генома и на техническую разницу дифференциации различных нуклеотидов в прочтённых последовательностях, общая схема работы для всех секвенаторов одна. Первый этап секвенирования — создание библиотеки случайных последовательностей ДНК, которые можно будет сшить с общедоступными адаптерными последовательностями. Второй этап — создание ампликонов с помощью ПЦР, которые будут использованы как образцы. Третий этап — определение первичной структуры всех фрагментов.

Roche/454 Life Sciences

Первая эффективно используемая на коммерческой основе платформа СНП. Компания 454 Life Sciences основана в 2000 году Джонатаном Ротбергом (в производство запущена в 2005 году). Данная технология представляет собой последовательный синтез методов эмульсионного ПЦР и пиросеквенирования.

Амплификация ДНК проходит в каплях воды в масляной эмульсии. В каждой капле воды находится одноцепочечная матрица ДНК, связанная с праймером на бусинке. Далее, каждая бусина помещается на чип, представляющий собой оптическое волокно. Туда же помещаются необходимые для секвенирования ферменты: ДНК-полимераза, люцифераза, АТФ-сульфурилаза. В последней сборке реакция секвенирования идет в ячейках объемом

$3,4 \cdot 10^6$ пкл, на стенках которых есть специальное металлическое покрытие, нивелирующее шум.

Illumina/Solexa]

Авторы метода — британские химики Шанкар Баласубраманиан и Дэвид Кленерман. Этот метод секвенирования использует прикрепленные к микросферам единичные молекулы ДНК. В 2006 году была запущена Solexa Genome Analyzer 1G, первая платформа, генерирующая короткие участки генома. После её приобретения компанией Illumina Genome Analyzer использует оптически прозрачные ячейки с 8 индивидуальными поверхностями, где связываются олигонуклеотиды. В отличие от пиросеквенирования удлинение последовательности происходит постепенно, что позволяет за раз с помощью камеры снимать большие ДНК-чипы.

Applied Biosystems/SOLiD

Платформа SOLiD (Supported Oligonucleotide Ligation and Detection System 2.0), разработанная Applied Biosystems — технология секвенирования коротких чтений, основанная на лигировании. Метод был предложен в лаборатории Георга Черча и опубликован в 2005 году (был заново просеквенирован геном *Escherichia coli*). По технологии SOLiD при секвенировании фрагменты ДНК лигируются на олигонуклеотидные адаптеры, прикрепленные к шарикам, далее они амплифицируются с помощью эмульсионной ПЦР.

Одномолекулярное секвенирование Helicos Biosciences

Первый метод секвенирования единичных молекул, разработанный HeliScore (Helicos BioSciences) имеет производительность около 1Gb/день. Принцип работы: после клональной амплификации образца происходит фрагментация ДНК с последующим полиаденилированием на 3'-конце с дальнейшим секвенированием, чередующимся с промыванием образцов нуклеотидами с флуоресцентной меткой.

Одномолекулярное секвенирование в реальном времени Pacific Biosciences

Метод одномолекулярного секвенирования в реальном времени (англ. *Single molecule real time sequencing*, SMRT) основан на наблюдении за работой единичной молекулы ДНК-полимеразы. Использование четырех флуоресцентно-меченных нуклеотидов позволяет определить какой нуклеотид присоединяет ДНК-полимераза в данный момент.

Ion Torrent Sequencing

Метод основан на связи между химической и цифровой информацией, что позволяет быстрее и проще секвенировать большое количество образцов. Эта технология также называется pH-индуцированным секвенированием. Процесс основан на детекции протонов, которые получают при синтезе цепи ДНК как побочный продукт. Как следствие, pH раствора меняется, что и можно детектировать.

Платформа Ion Torrent отличается от остальных технологий секвенирования тем, что в ней не используются модифицированные нуклеотиды и оптические методы. Метод Ion Torrent позволяет исследовать транскрипты, малые РНК, проводить ChIP-seq. Более того, с его помощью можно изучать геномы микробных сообществ.

Нанопоровое секвенирование

Метод основан на измерении тока ионов через единичную нанопору в непроводящей мембране. При прохождении через эту пору нуклеотидов ток падает. Время, на которое изменяется ток ионов, и величина этого падения зависят от того, какой нуклеотид в данный момент находится внутри поры.

Быстрота и дешевизна методов СНП, недоступная ранее, спровоцировала бум в индустрии геномных исследований. Благодаря СНП появилась возможность делать ранее технически недоступные эксперименты.

4. Применение секвенирования нового поколения

Геномный анализ

Стали доступны геномы разных по сложности живых систем от микроорганизмов до человека, включая геном цитогенетически находящихся в норме клеток миелоидной лейкемии. Увеличение длины чтений ускорило сборку целых геномов.

Направленное пересеквенирование геномов

Секвенирование определенных регионов в геномах используется для выявления полиморфизмов (в частности однонуклеотидных полиморфизмов) и мутаций в генах, задействованных в развитии опухолевых и других заболеваний. Примером одной из таких широкомасштабных работ может служить проект 1000 геномов.

Применение в сочетании с другими методами

Использование СНП позволило определять места связывания белков с ДНК (ChIP-seq), взаимодействующие участки ДНК (Определение конформации хромосом) и участки открытого хроматина на протяжении всего генома.

Удешевление и распространение СНП позволяет осуществлять проекты ENCODE и modENCODE.

Метагеномика

СНП широко используется в исследованиях разнообразия микроорганизмов в различных образцах (например, микробные популяции в океане и почве, идентификация новых вирусов в органах, подлежащих трансплантации, описание характерной для ЖКТ микрофлоры и т. д.)

Секвенирование транскриптома

На основе СНП создан новый подход РНК-секвенирования (RNA-seq)^[10] для картирования и подсчёта транскриптов в биологических образцах. У этого метода есть преимущества над используемым ранее методом ДНК-микрочипов. Например, ДНК-чипы зависят от перекрытия геномных последовательностей, в то время как RNA-seq позволяет охарактеризовать транскрипцию без предварительного знания места начала транскрипции.

Картирование ДНК-связывающих белков и анализ хроматина

Идентификация регуляторных белков, ассоциированных с геномами, было значительно ускорено с помощью введения в лабораторную практику иммунопреципитации хроматина и гибридизации на микрочипах.

Перспективы применения секвенирования в медицине

В недалеком будущем технологии секвенирования станут более быстрыми и менее дорогими, что позволит использовать их для идентификации мишеней для лекарственной терапии онкологических больных. Уже в 2013 году анализ по технологии секвенирования следующего поколения (en: next-generation sequencing (NGS)) от момента биопсии до завершения NGS занимал менее 100 дней. Столько же времени занимает секвенирование всего генома (whole genome sequencing, WGS) и секвенирование всего транскриптома (whole transcriptome sequencing, WTS)

1.4 Лекция №4 (2 часа).

Тема: «Иммунологические методы исследования»

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Реакция агглютинации и ее разновидности
2. Реакция преципитации и ее разновидности
3. Иммуоэлектрофорез
4. Реакция иммунного лизиса
5. Реакция связывания комплемента
6. Иммуоферментный анализ
7. Молекулярно-генетические методы исследования

1.4.2 Краткое содержание вопросов:

Иммунодиагностика — использование реакций иммунитета для диагностики инфекционных заболеваний.

Реакции иммунитета — реакции между антигеном (Аг) и антителом (Ат). Они описываются простым уравнением $Аг + Ат = \text{результат}$. Основная их характеристика — специфичность. Реакции иммунитета в лаборатории применяют в двух направлениях:

— для серологической диагностики, т.е. для определения в исследуемом материале (чаще сыворотка крови) неизвестных Ат, используя для этого стандартный антигенный препарат-диагностикум, приготовленный, как правило, из эталонных штаммов микроорганизмов;

— для иммуноиндикации, т.е. для обнаружения в исследуемом материале микробных Аг, т.е. определения присутствия антигенов возбудителя с помощью известного Ат, содержащегося в иммуно-диагностических сыворотках.

1. Реакция агглютинации и ее разновидности

Агглютинация — склеивание и осаждение микроорганизмов, эритроцитов или других клеток при действии на них специфических Ат в присутствии электролита. Выделяют две фазы реакции.

— В первой, специфической фазе происходит взаимодействие Ат с Аг и образование комплекса Аг-Ат.

— Во второй, неспецифической фазе комплекс Аг—Ат выпадает в осадок. Это происходит только в присутствии электролита.

Реакцию агглютинации по идентификации ставят как в ориентировочном, так и в развернутом вариантах. Ориентировочную реакцию агглютинации ставят на предметном стекле с неразведенными или разведенными 1:10 адсорбированными агглютинирующими сыворотками, содержащими Ат одной специфичности. Результаты учитывают невооруженным глазом через 2—5 мин. Реакция считается положительной, если в результате отмечают появление хлопьев, жидкость становится прозрачной. При отрицательном результате жидкость остается мутной, хлопья не образуются.

При постановке реакции агглютинации по идентификации с не-адсорбированными сыворотками на стекле необходим второй развернутый вариант: иммунную агглютинирующую сыворотку разводят до титра, обязательно используя разведение до 1/2 титра. Культуру считают идентичной взятой сыворотке, если она агглютинируется ей в разведении 1/2 титра и выше, так как в этих разведениях содержатся только видовые Ат.

Реакцию агглютинации ставят и с целью определения Ат в сыворотке больного, а также их количества. В качестве Аг используют диагностикум. В пробирках готовят ряд двукратных разведений сыворотки. В каждую пробирку вносят 1—2 капли диагностикума, помещают их на 2 ч в термостат при 37 °С, после чего предварительно учитывают результаты, начиная с контрольных пробирок. Отсутствие агглютинации в контрольных пробирках (помутнение) и появление хлопьев в опыте свидетельствуют о наличии Ат. Диагностически значимым считают нарастание титра Ат в парных сыворотках больного, взятых в разные дни болезни. Подобная динамика свидетельствует об инфекционном происхождении Ат.

Существуют разновидности реакции агглютинации — реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), реакция коагглютинации, реакция торможения пассивной (непрямой) гемагглютинации (РТПГА).

Реакция пассивной гемагглютинации

Пассивная (непрямая) гемагглютинация — взаимодействие Ат (Аг) с Аг (Ат), предварительно адсорбированными на поверхности эритроцитов. Если комплекс образовался, то эритроциты склеиваются и выпадают в осадок. Реакцию ставят в лунках полистироловых планшетов, в которых готовят разведение парных сывороток, в последних лунках 2 контроля: заведомо положительная сыворотка и физиологический раствор. Затем последовательно во все лунки с разведениями добавляют антигенный эритроцитарный диагностикум и инкубируют 2 ч. Если произошла гемагглютинация, то эритроциты оседают на дне лунки, заполняя всю лунку (зонтик). Если результат отрицательный, эритроциты оседают в центре (пуговка). Это позволяет установить титр Ат и его нарастание.

При иммуноиндикации реакцию ставят качественно с антительным эритроцитарным диагностикумом и фильтратом исследуемого материала.

Реакция коагглютинации

Реакцию коагглютинации чаще используют в вирусологии, так как она позволяет обнаружить невидимую на глаз вируснейтрализацию. Она основана на том, что *Staphylococcus aureus* имеет в составе клеточной стенки белок А, способный связываться с Fc-фрагментом IgG и IgM. Активные центры Ат свободны и могут взаимодействовать со специфическими детерминантами Аг. При постановке реакции на предметное стекло наносят взвесь стафилококков, сенсibilизированных соответствующими Ат, к которой добавляют каплю взвеси исследуемых вирусов. Если Аг соответствуют Ат, через 30—40 с происходит агглютинация между образовавшимися комплексами Аг—Ат, содержащими белок А.

Реакция торможения пассивной (непрямой) гемагглютинации

РТПГА используют для обнаружения Аг возбудителей в исследуемом материале при добавлении к нему диагностической иммунной сыворотки. При наличии гомологичного Аг происходит связывание Ат, а после добавления сенсibilизированных Аг эритроцитов их агглютинации не происходит. Отсутствие гемагглютинации расценивается как положительный результат реакции. Реакцию РТПГА применяют и для обнаружения специфических Ат. Для этого к исследуемой сыворотке добавляют Аг. Если в ней содержатся специфические Ат, то они связываются с Аг. При добавлении эритроцитов, сенсibilизированных Ат, их склеивания не происходит. Оценку результатов лучше проводить при работе с разведениями парных сывороток.

2. Реакция преципитации и ее разновидности

Реакция преципитации — осаждение (преципитация) Аг, находящегося в дисперсном, коллоидном состоянии под действием специфических Ат. Существует несколько разновидностей постановки этой реакции.

Кольцепреципитация

Эту реакцию ставят в преципитационных (узких) пробирках с иммунной преципитирующей сывороткой, на которую наслаивают растворимый Аг. При эквивалентном соотношении Аг и Ат на границе двух растворов образуется белое кольцо преципитации.

Если в качестве Аг в этой реакции используют прокипяченный и профильтрованный водный экстракт органов и тканей, то реакцию называют термопреципитацией (реакция Асколи для диагностики сибирской язвы).

Иммунодиффузия

Метод основан на взаимодействии гомологичных Ат и Аг в агаровом геле с образованием полос и колец преципитации. Иммунодиффузию используют для определения токсигенности дифтерийных бактерий, концентрации иммуноглобулинов в сыворотке и др.

В последнем случае на стеклянную пластинку строго определенного размера (или в чашку Петри) аккуратно заливают расплавленный агар, содержащий в определенной концентрации антисыворотку к тому или иному классу иммуноглобулинов. В центре слоя застывшего агара и по периферии пробойником делают лунки, располагая их на определенном, одинаковом расстоянии друг от друга. В центральную лунку вносят стандартную сыворотку с известной концентрацией иммуноглобулина, например IgG, а в периферические лунки — исследуемые сыворотки. Из стандартных и исследуемых сывороток IgG диффундирует в агар. При образовании комплекса происходит его диффузия в агар, образуются кольца преципитации. Диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации иммуноглобулина. Величину диаметра соотносят с калибровочной прямой, построенной по стандартным сывороткам, и определяют содержание иммуноглобулина в исследуемых сыворотках.

3. Иммуноэлектрофорез

Иммуноэлектрофорез основан на электрофоретическом разделении Аг в геле с последующей их преципитацией Ат иммунной сыворотки. Иммуноэлектрофорез позволяет провести углубленный анализ и идентификацию отдельных Аг в многокомпонентных системах.

На пластинку из стекла наносят слой агара. Вначале антигены, помещенные в центре такой пластинки, разделяют в электрическом

поле. Затем в канавку агара, вырезанную параллельно линии разделения Аг, добавляют иммунную сыворотку, происходит диффузия компонентов реакции навстречу друг другу, и в месте встречи образуются дуги преципитации. С помощью этого метода анализируют состав белков сыворотки крови, спинномозговой жидкости, мочи.

Иммуноблоттинг

Метод основан на сочетании электрофореза и иммуноферментного анализа (ИФА). В полисахаридном геле с помощью электрофореза выделяют Аг, затем проводят блоттинг (наложение), т.е. переносят его из геля на активированную бумагу или нитроцеллюлозную мембрану и продолжают электрофорез. После чего на пленку наносят сыворотку пациента и инкубируют. Далее отмывают несвязавшиеся Ат и проводят ИФА. Для этого на пленку наносят антисыворотку к иммуноглобулинам человека, меченную ферментом, и субстрат,

который меняет окраску при взаимодействии с ферментом. Если образуется комплекс Аг—Ат—антисыворотка к иммуноглобулинам, на носителе появляются окрашенные пятна.

4. *Реакция иммунного лизиса.* Реакция основана на том, что Ат-лизины способны растворять микроорганизмы только в присутствии комплемента. Для проведения реакции готовят ряд разведений инаktivированной нагреванием сыворотки, затем добавляют взвесь микроорганизмов и комплемент. Всё инкубируют. После инкубации в термостате проводят оценку результатов с помощью высевов с количественным учетом. Для контроля используют исследуемую культуру микроорганизмов, нормальную сыворотку и комплемент.

5. *Реакция связывания комплемента*

Реакция связывания комплемента (РСК) — сложная, многокомпонентная реакция, состоящая из двух систем:

- первая система (тест-система): Аг+Ат+комплемент, где Аг или Ат — неизвестный компонент;
- вторая система (индикаторная, или гемолитическая, система): эритроциты барана + гемолитическая сыворотка.

Если на первом этапе реакции произошло специфическое взаимодействие Аг и Ат, то комплемент адсорбируется на образовавшемся комплексе. Процесс связывания комплемента визуально не проявляется. В связи с этим используют вторую индикаторную систему — гемолитическую, состоящую из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки (гемолитическую сыворотку получают при иммунизации кролика эритроцитами барана). Эта индикаторная система высокочувствительна к свободному комплементу. В его присутствии происходит иммунный гемолиз.

В зависимости от присутствия обнаруживаемых Аг или Ат возможно два исхода.

- Если на первом этапе образовался комплекс Аг-Ат, то на нем адсорбируется комплемент. При добавлении гемолитической системы гемолиза не происходит, так как комплемента в свободном состоянии не осталось. (Все компоненты реакции берутся в строго определенных рабочих дозах.)
- Если в исследуемой сыворотке комплекс Аг—Ат не образовался, то комплемент остался в свободном состоянии, и он адсорбируется на комплексе гемолитической системы. Визуально это проявляется в лизисе эритроцитов и образовании «лаковой» крови.

Перед постановкой РСК все компоненты, участвующие в реакции, титруют.

Титр гемолитической сыворотки — ее наибольшее разведение, которое вызывает полный гемолиз эритроцитов в течение 1 ч при 37 °С.

Рабочая доза гемолитической сыворотки равна тройному ее титру.

Титр комплемента — наименьшее его количество, которое вызывает полный гемолиз эритроцитов.

Рабочая доза комплемента — в основном опыте РСК (в объеме 0,5 мл) должна быть выше титра на 20—30%.

Тктр антигена — минимальная доза, не вызывающая задержку гемолиза.

Для РСК используют рабочую дозу Аг = 1/2 ее титра.

Реакции иммунитета с использованием метки

Реакция иммунофлюоресценции

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) основана на использовании флюорохромов, химически связанных с Ат. При этом меченные люминесцентной меткой Ат вступают во взаимодействие с корпускулярным Аг. Образовавшиеся специфические комплексы обнаруживают по интенсивному свечению, регистрируемому с помощью люминесцентного микроскопа. Существуют разновидности этой реакции.

При постановке прямой РИФ используют противомикробные флюоресцирующие Ат, т.е. реакция происходит против возбудителя.

Непрямая РИФ (РНИФ) проходит в два этапа. На первом этапе используют обычные антисыворотки к анализируемому возбудителю. Образовавшиеся при этом комплексы Аг-Ат на втором этапе выявляют с помощью люминесцентной сыворотки, которая содержит меченые Ат против иммуноглобулина того вида животного, сыворотка которого использована на первом этапе реакции.

6. Иммуноферментный анализ

Метод основан на использовании меченных ферментом сывороток. Индикацию образовавшихся комплексов проводят по химической реакции между ферментом и субстратом, сопровождающейся изменением цвета. Интенсивность окраски хромогена соответствует количеству образовавшихся комплексов Аг и меченных ферментом Ат. В качестве фермента чаще всего бывает пероксидаза или щелочная фосфатаза. Для проведения анализа используют твердофазный носитель с сорбированным Аг или Ат. Реакцию можно ставить для обнаружения как Аг, так и Ат.

Основные этапы реакции по обнаружению Ат:

- Сорбция известного Аг в лунке планшета.
- Внесение исследуемой сыворотки; промывка.
- Внесение меченной ферментом антиглобулиновой сыворотки; промывка.
- Внесение хромогенного субстрата.
- Регистрация реакции.

Основные этапы реакции по обнаружению Аг:

- Сорбция известного Ат в лунке планшета.
- Внесение Аг содержащего материала; промывка.
- Внесение Ат той же специфичности, но другого вида животного.
- Внесение меченной ферментом сыворотки против иммуноглобулинов того вида животного, сыворотка которого была использована последней; промывка.
- Внесение хромогенного субстрата.
- Регистрация реакции.

7. Молекулярно-генетические методы исследования

ДНК-гибридизация

Различают две методики гибридизации:

- гибридизация, проводимая в растворе;
- гибридизация, проводимая на твердой поверхности.

Гибридизация в растворе

При реализации этого метода искомая нуклеиновая кислота и зонд взаимодействуют в водной реакционной смеси, что повышает скорость процесса гибридизации.

Метод ДНК-гибридизации основан на способности денатурированной одноцепочечной ДНК достраивать гомологичную цепь в бесклеточной системе. В качестве материала для второй цепи используют ДНК-зонды (коммерчески производимые

фрагменты молекулы известной ДНК, гомологичные фрагментам искомой ДНК возбудителя, меченные радиоактивным изотопом или ферментом).

При наличии в исследуемом материале гомологичных участков ДНК по закону комплементарности ДНК-зонд взаимодействует с ним.

Учет результатов проводят по уровню радиоактивности или при добавлении к пробе субстрата, который соответствует используемому в зонде ферменту. Образование специфического комплекса субстрат-фермент означает, что в исследуемом материале есть ДНК, соответствующая ДНК-зонду.

Гибридизация на твердом носителе (блот-гибридизация)

Основана на ДНК-гибридизации зонда на твердой поверхности, в качестве которой используют полимерный мембранный фильтр. Основные этапы исследования:

- исследуемый образец обрабатывают ультразвуком для получения коротких фрагментов находящихся в нем ДНК;
- проводят денатурацию нуклеиновой кислоты;
- денатурированные нуклеиновые кислоты наносят на мембранный фильтр и фиксируют;
- проводят предварительную гибридизацию со специальным буфером при 65 °С;
- добавляют гибридизационный буфер, который содержит денатурированный зонд, и проводят гибридизацию при 65 °С.

«Сэндвич»-гибридизация

Этот метод предполагает использование двух видов ДНК-зондов, которые гомологичны различным участкам искомой нуклеиновой кислоты. Чтобы связать искомую нуклеиновую кислоту, присутствующую в исследуемом образце, один зонд фиксируют на мембране. После окончания процесса гибридизации мембрану отмывают от исследуемого материала и добавляют раствор, который содержит второй зонд, несущий метку. После этого процесс гибридизации повторяют, при этом меченый зонд взаимодействует с искомым участком нуклеиновой кислоты. Окончательная детекция зависит от характера меток, которые могут быть ферментно-гибридизационными, флюоресцентными, хемилюминесцентными и т.д.

Гибридизация in situ

Процесс гибридизации проводят непосредственно на срезе или в мазке с использованием зондов. Основу метода составляет принцип твердофазной гибридизации или гибридизации в растворе. Используемый в реакции зонд содержит флюоресцентную метку. После окончания процесса гибридизации связавшиеся молекулы в исследуемом мазке или срезе выявляют под флюоресцентным микроскопом. При данном методе возможен количественный анализ.

Полимеразная цепная реакция

Принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) основан на естественной репликации ДНК, которая включает денатурацию спирали ДНК, расхождение нитей и комплементарный синтез новых нитей ДНК. ПЦР обеспечивает амплификацию фрагментов генома и быстрое накопление определенной последовательности ДНК. В результате получают большое количество ДНК, которое достаточно для проведения анализа различными методами детекции.

Для реакции используют набор праймеров фрагментов ДНК, которые являются маркерами данного возбудителя. При добавлении такого праймера к пробе исследуемого

материала, содержащей денатурированную одноцепочечную ДНК возбудителя, происходит их соединение с комплементарным участком ДНК. Образовавшиеся двунитевые фрагменты ДНК служат матрицей для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации, и так повторяется много раз, поэтому реакция носит цепной характер. За 2-3 ч происходит 30-40 циклов амплификации, что приводит к образованию большого количества соответствующих копий нуклеотидных последовательностей, которое можно зарегистрировать.

Компоненты реакции:

- Праймеры-олигонуклеотиды, состоящие из 15-30 нуклеотидов, комплементарных участкам на идентифицируемой матричной ДНК.
- Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов — строительный материал, используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.
- Taq-полимераза, обладающая ДНК-полимеразной активностью.
- Буферный раствор, катализатор фермента Taq-ДНК-полимеразы.
- Исследуемый образец — препарат, который служит мишенью для последующей амплификации.

ДНК-чипы

Технология ДНК-чипов основана на гибридизации нуклеотидной последовательности исследуемого материала с известными ДНК-последовательностями, расположенными в определенном порядке, иммобилизованными на поверхности стекла или кремня. Результат реакции детектируют по флуоресценции зонда, предварительно меченного флуорохромом и гибридизированного с одной из иммобилизованных проб.

Биочип — матрица, состоящая из ячеек. В каждой ячейке закреплен олигонуклеотид (последовательность из нескольких нуклеиновых кислот). Каждый нуклеотид имеет одинаковую длину и отличается от другого последовательностью аминокислот.

Исследуемый образец наносят на все ячейки чипа, а затем через некоторое время сливают. Если имеется нуклеотид комплементарный прикрепленному в ячейке, то между ними образуется связь, и после промывания они не удаляются. Затем образец исследуют под флуоресцентным микроскопом, который регистрирует результат образования комплекса по световому сигналу. Светящиеся ячейки кодируют олигонуклеотиды исходной пробы. Таким образом, зная нуклеотиды, которые были изначально помещены в данной ячейке, можно сделать вывод о составе фрагмента исследуемой ДНК.

1.5 Лекция №5 (2 часа).

Тема: «Методы определения персистентных характеристик микроорганизмов»

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Антилизосимная активность
2. Антилактоферриновая активность
3. Антикомплиментарная активность

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

1. **Антилизосимная активность микроорганизмов.**

Лизоцим (мурамидаза) является ферментом класса гидролаз, расщепляющим β 1-4-гликозидные связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой в гликановой составляющей полимерной молекулы бактериального пептидогликана. За счет этого лизоцим обладает достаточно широким спектром литической активности и выполняет в макроорганизме функцию неспецифического антибактериального барьера (Бухарин, 1974).

В связи с этим логично было предположить наличие у ряда микроорганизмов способности к ингибированию и даже к утилизации лизоцима. Основанием для такого предположения послужили данные А. М. Безбородова (1980), установившего, что среди актиномицетов имеются штаммы, угнетающие действие лизоцима, им был выделен штамм *Act. herbescens*-4, из которого удалось извлечь ингибитор мурамидазы.

Систематические исследования по изучению факторов естественной резистентности организма при различных формах инфекционной патологии выявили стабильное снижение лизоцимного параметра на определенных этапах инфекции.

В связи с этим было выдвинуто предположение, что подавление лизоцима при патологии инфекционного генеза обусловлено, вероятно, способностью возбудителя инактивировать мурамидазу - это важнейшее звено неспецифической резистентности.

Проверка теоретической посылки была осуществлена экспериментальным путем с использованием методического приема, применяемого в бактериологии при изучении явления бактериоциногенности. Принцип «отсроченного антагонизма» был использован при разработке методики определения способности бактерий деградировать лизоцим (Бухарин и др., 1984), который позволил осуществить количественную оценку изучаемого признака микроорганизмов.

Выявленная способность бактерий инактивировать лизоцим была определена как их антилизоцимная активность (Бухарин, Усвяцов, 1982). Изучение широты и диапазона распространения этого признака микроорганизмов осуществлено почти на 3000 культур 9 родов и 25 видов. Эти данные в обобщенном виде позволили заключить, что антилизоцимная активность стабильно в 88-100% встречается у грамотрицательных микроорганизмов как палочковидных, так и кокковых форм (шигеллы, сальмонеллы, кишечные палочки, иерсинии, гонококки, менингококки, пневмококки и др.). Что касается грамположительных кокков (стафилококки, стрептококки), то антилизоцимный признак у них выявлялся значительно реже (Усвяцов, 1987).

Экспериментальные материалы по выяснению биологической роли антилизоцимного признака у микроорганизмов выявили прямую корреляционную связь способности бактерий к деградации лизоцима и их внутриклеточным паразитированием. При изучении длительности паразитирования 18 штаммов шигелл Зонне и Флекснера в конъюнктивальном мешке морских свинок, инфицированных этими возбудителями, Н. В. Немцева (1984) отмечала, что штаммы с низким уровнем антилизоцимной активности выделялись в течение 3 недель от момента инфицирования, тогда как микроорганизмы с высокой антилизоцимной активностью выделялись в течение 5 недель.

Экспериментальным путем на животных, культуре ткани и методом популяционного анализа было доказано, что антилизоцимный признак можно рассматривать как маркер персистенции бактерий, способных к внутриклеточному паразитированию (Бухарин, 1987).

В исследованиях Немцевой Н.В. (1984) был охарактеризован диапазон уровня антилизоцимной активности у дизентерийных бактерий: низкий (от 0 до 5 мкг), средний

(от 6 до 10 мкг) и высокий (выше 10 мкг). Изучена динамика антилизотимной активности шигелл. Обнаружена связь антилизотимной активности шигелл с их вирулентностью. На модели куриных эмбрионов впервые показана способность шигелл истощать лизотим в клетках и тканях организма, где шигеллы с низкой антилизотимной активностью снижали уровень лизотима в клетках с 47,2 мкг до 25,3 мкг, тогда как штаммы с высокой антилизотимной активностью приводили к более значительному истощению мурамидазы в клетках - до 7,5. мкг. В последующем этот вывод был подтвержден и в опытах с менингококком (Зарифуллина, 1986) и в клинических условиях при шигеллезах (Федосеева, 1985).

В итоге было сформулировано положение, о модельной системе «лизотим хозяина - антилизотим возбудителя», позволяющей с учетом специфичности не только выяснить патогенетические особенности инфекции, но и использовать их в прикладных целях и, в первую очередь, для прогнозирования реконвалесцентного бактерионосительства.

В дальнейшем были проведены эксперименты, позволившие определить генетическую природу антилизотимного признака и изучить плазмидный профиль ДНК, кодирующей антилизотимную активность у клебсиелл, с молекулярной массой в 60 МД (Бондаренко, Яблочков, 1987).

Доказано, что антилизотимный признак бактерий является конститутивным, секретлируемым фактором, специфически взаимодействующем с лизотимом и инактивирующим его. При помощи биохимических методик удалось выделить антилизотимный фактор из кишечной палочки 0-114 и клебсиеллы пневмонии 22-110 и определить его химическую природу - термостабильный анионный белок с молекулярным весом 21000 Д, инактивируемый трипсином (Соколов, 1990).

Оценивая биологическую целесообразность антилизотимного фактора у бактерий, следует отметить его не случайное появление у микроорганизмов что, вероятно, связано с широким кругом хозяев, располагающих лизотимом, как средством защиты. Смысловая нагрузка приобретения этого фактора бактериями - обеспечить себя дополнительным механизмом выживания, «расчищая» эконису в условиях внутриклеточного паразитирования. (Бухарин, 1990)

2. Антилактоферриновая активность. Лактоферрин (ЛФ) — железосвязывающий гликопротеин, являющийся важным маркером воспалительного процесса, одним из факторов неспецифической защиты организма, показателем острой фазы (Сухарев и др., 1990).

Впервые лактоферрин молока был описан в 1939 году и выделен вначале из коровьего, затем из женского молока методами фракционирования сульфатом аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и КМ-сефадексе (Айсен, 1978; Sorensen et al., 1939). В 1991 году была расшифрована первичная структура ЛФ молока коровы (Pierce et al., 1991).

Местом синтеза ЛФ молока, слюны, слез и других экскретов считаются железистые клетки соответствующих эпителиальных тканей, а ЛФ сыворотки — нейтрофилы (Masson et al., 1969). Установлены одинаковые физико-химические свойства и иммунохимическая идентичность экскреторного и сывороточного ЛФ (Кокряков и др., 1988; Немцова и др., 1988; Николаев, 1985).

Основной особенностью ЛФ, определяющей спектр его многочисленных функций является его способность специфически связывать ионы железа и некоторых других металлов переходной группы. Функции, в основе которых лежит комплексообразующая

способность ЛФ - детоксицирующая, транспортная, антимикробная (Oram & Reiter, 2004). Несмотря на подробное изучение ЛФ в течение многих лет, его основная функция до сих пор не ясна.

Известно, что рост и развитие желудочно-кишечного тракта новорожденных животных, вскармливаемых материнским молоком, интенсивнее, чем у вскармливаемых молочными смесями (Heierd et al., 1984; Widdowson, 1985). Nichols с соавторами (1990), измеряя встраивание тимидина в ДНК клеток крысы *in vitro*, показали, что ЛФ человека является фактором, стимулирующим рост, причем такая способность ЛФ не зависит от наличия связанного железа. Это открытие увеличивает значимость ЛФ в желудочно-кишечном тракте ребенка: ЛФ не только является источником железа и аминокислот, но и способствует клеточному росту (Nichols et al., 1990).

Создавая и поддерживая дефицитную по катионам железа и других металлов переменной валентности, необходимых для роста бактерий среды, ЛФ является одним из ведущих молекулярных факторов, сдерживающих размножение и рост бактерий и низших грибов на поверхности барьерных эпителиев (Bullen et al., 1978).

ЛФ посредством связывания ионов железа и других металлов переменной валентности из среды поверхностных структур оболочек микроорганизмов лишает последних жизненно важных микроэлементов, входящих в состав цитохромов дыхательной цепи, каталаз, пероксидаз и супероксиддисмутаза, кроме этого, снижает их резистентность к токсическому действию химических реактивных производных кислорода. По мнению американского исследователя Е. Weinberg (1998), удержание железа ЛФ и ТФ во внутренней среде животного организма является одним из ведущих механизмов защиты от инфекций и опухолевого роста.

Однако многие патогенные бактерии имеют специфические рецепторы, способные связывать ЛФ и утилизировать связанное с данным белком железо.

Бактериостатическое действие ЛФ в отношении микрофлоры – *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. mutior*, *S. pneumoniae*, *Vibrio cholerae* 5698, *Pseudomonas aeruginosa* (Кокряков и др., 1989) присуще только ненасыщенному железом ЛФ – апоЛФ.

Известно, что ЛФ коровьего молока проявляет бактериостатическую активность по отношению к бактериям. Наиболее чувствительны к его действию оказались штаммы *Escherichia coli* (Rainard, 1950), а некоторые штаммы *Staphylococcus aureus* проявляли устойчивость к ЛФ. Это заставляет предполагать, что механизм антибактериального действия ЛФ сложнее, нежели простое удаление железа из среды. Было показано, что ЛФ вызывает изменение проницаемости наружной мембраны некоторых грамотрицательных бактерий (Ellison, 1988). ЛФ способен выщеплять молекулы липосахаридов (эндотоксинов) из наружной мембраны грамотрицательных бактерий, что происходит в результате связывания ЛФ Mg^{2+} и Ca^{2+} , которые стабилизируют наружную мембрану. Возможно также взаимодействие электростатического характера слабоосновного ЛФ (pH~8,5) с карбоксильными группами в составе мембраны. Кроме того, вероятно дезорганизация оболочки бактерии приводит к активации вещества, вызывающего аутоповреждение (Ellison et al., 1985).

Совместное действие ЛФ с лизоцимом, также являющимся бактериостатиком и содержащимся в грудном молоке, может приводить к синергичному бактерицидному эффекту (Ellison & Giehl, 1991).

При бактериальных инфекциях и нагноительных процессах концентрация ЛФ нейтрофилов в плазме возрастает параллельно количеству нейтрофилов. При этом

увеличивается транспорт железа с ТФ на ЛФ, который, будучи нагруженным железом, переносит его клеткам ретикулоэндотелиальной системы, где железо откладывается в виде ферритина (Rainard, 1950). Вирусная инфекция приводит к снижению уровня ЛФ в нейтрофилах и плазме, несмотря на наличие лейкоцитоза при вирусных заболеваниях. Снижение сывороточного ЛФ отмечается также при радиоактивном облучении, введении цитостатиков и кортикостероидов (Bellamy et al., 1992).

Возможно, что все клетки животных и растений, чтобы выжить имеют «внутриклеточный пищеварительный аппарат», образованный лизосомной системой. В систему входят совокупность мембранных пузырьков, пребывающих в постоянном изменении, лизосомы, которые содержат кислые гидролазы для «очистки» клетки и поглощения бесполезного клеточного материала. Именно эти кислые гидролазы находятся в первичных гранулах многоядерных нейтрофилов, тогда как вторичные или специфические гранулы этих лейкоцитов содержат фосфатазу, часть лизоцима и ЛФ. В момент фагоцитоза происходит параллельное внеклеточное освобождение кислых гидролаз и ЛФ. Во всех клетках организма лизосомный аппарат обеспечивает переваривание материалов внеклеточного происхождения (гетерофагия) и материалов самой клетки (аутофагия). В секреторных клетках лизосомы, кроме того, обеспечивают функцию кринофагии, что позволяет поглощать избыток секреторных компонентов и поддерживать гомеостаз желез внешней секреции. В связи с этим предполагается участие ЛФ в процессах внутриклеточного пищеварения (Bullen et al., 1978).

Бактерицидные свойства ЛФ в отношении некоторых видов микроорганизмов могут быть объяснены образованием коротких основных (катионных) пептидов N-концевых участков белка путем ограниченного протеолиза. Пептиды ЛФ крупного рогатого скота с аминокислотной последовательностью 1-54 и более короткий 1-41, так называемый лактоферрицин В, обладают еще большим, чем ЛФ микробоцидным действием, которое объясняется выраженной основностью аминокислотной последовательности на концах молекул этих пептидов (Ellison et al., 1985; Кокряков и др., 1989, 1999).

В настоящее время известно, что штаммы, обладающие антилактоферриновой активностью способны персистировать в организме.

Выраженность антилактоферриновой активности определяется видовой принадлежностью микроорганизма (Валышева, 2003). По данным Alugupalli и Kalfas (1996) деградация лактоферрина была более выраженной под действием *Porphyromonas gingivalis* и *Capnocytophaga sputigena*, слабой под действием *Capnocytophaga ochracea*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* и *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter sputorum*, *Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Bacteroides forsythus* и *Peptostreptococcus micros*. В отличие от *P.gingivalis* на деградацию лактоферрина бактериями *C.sputigena* не оказывали влияние ингибиторы протеаз; обнаруженные фрагменты лактоферрина проявляли электро-форетическую подвижность дегликозилированных форм лактоферрина. Кроме того, слабая реактивность или отсутствие взаимодействия этих фрагментов со специфическим к сиаловой кислоте лектином свидетельствует, что они десилированы (Alugupalli, 1996). Штаммы *Porphyromonas gingivalis* полностью деградируют ЛФ, в то время как протеазы *Prevotella intermedia* и *Prevotella nigrescens* приводят только к частичной деградации белка (Tomita et al., 2002).

В настоящее время проблема регуляции антилактоферриновой активности микроорганизмов различными факторами является не достаточно изученной и требует дальнейших исследований в этом направлении. В частности, остаются открытыми вопросы о действии эндогенных факторов желудочно-кишечного тракта, а также лечебно-профилактических препаратов (антибиотиков, лекарственных растений, пробиотиков, пребиотиков и др.) на антилактоферриновую активность микроорганизмов.

3.Антикомплиментарная активность бактерий.

Открытие комплемента в конце XIX в. связывают с именем Жюля Борде, работавшего в лаборатории И. И. Мечникова в Париже. Первые данные указывали, что в сыворотке крови животных имеется термолабильное вещество, которое усиливает опсонизацию бактерий и в присутствии антител убивает их. Опсонизирующая и лизирующая активность сыворотки связана с большой группой белков, объединенных в единую систему комплемента. Понятие «комплемент» было предложено в 1895 г. немецким ученым П. Эрлихом. Наибольшее количество его содержится в сыворотке крови морской свинки. Взаимодействие антител с антигеном провоцирует каскад реакций, состоящий из последовательной активации одного белка системы предыдущим белком этой системы. Некоторые из членов системы комплемента связываются ковалентно с бактериями, опсонизируя их для успешного поглощения фагоцитами, обладающими соответствующими рецепторами к комплементу. Другие члены функционируют как хемоаттрактанты, привлекая в зону воспаления, где происходит активация системы комплемента, фагоцитирующие клетки. Заключительные компоненты каскадной реакции выступают в качестве литических факторов, разрушая бактерии (Галактионов , 2004).

Исследование взаимодействия системы комплемента с бактериальными клетками имеет столь же многолетнюю историю, что и изучение самой системы. Открытый благодаря своим бактерицидным свойствам, комплемент сразу привлек внимание исследователей, занимающихся изучением защитных сил макроорганизма, а также бактериологов, изучавших вирулентные характеристики бактерий. Так, Л.С Резникова ссылается на работу Соса (1914), в которой указывается на способность бактериальных суспензий инактивировать комплемент, причем различные бактерии обладали различным антикомплементарным действием. В частности, сенная палочка, по данным Соса, «продуцирует растворимые антикомплементарные вещества, в то время как сарцина инактивирует комплемент путем адсорбции» (Резникова, 1967). Об антикомплементарных свойствах бактериальных суспензий упоминается в работе Д.Г Кудлай (1954), где исследовалась взаимосвязь этих свойств с морфологическими признаками бактерий. Вероятно, наиболее существенным вкладом в объяснение подобных фактов явилось открытие Пиллемером в 1954 году пропердина и последовавшая за этим открытием разработка теории альтернативного пути активации комплемента. Открытие альтернативного пути активации во многом объяснило общеизвестный тогда факт адсорбции комплемента бактериальными антигенами (Бойд , 1969).

В настоящее время изучению взаимодействия комплемента с бактериальными клетками посвящено большое количество работ (Игнатов, 1987). Однако термин «антикомплементарная активность бактерий» практически не используется исследователями так как он употребляется в отношении, например, нативных декстранов (Преображенская и др., 1977). Очевидно это связано с возможностью по-разному его интерпретировать. Во-первых, инактивация комплемента при контакте с бактериями

может происходить вследствие его активации по альтернативному пути, а также непосредственной активации CI в отсутствии антител (так называемая неклассическая активация CI) бактериальными липополисахаридами (Lachmann и др., 1984). Во-вторых, бактериальные клетки могут продуцировать протеолитические ферменты, разрушающие белки системы комплемента (Goldlust, 1968, Vaca Pacheco, 1988). В-третьих, весьма вероятной остается возможность продукции специфических ингибиторов комплементарных протеинов, которые широко распространены в микробном мире. Резистентность бактерий к бактерицидному действию системы комплемента, рассматриваемая Р. W Taylor в качестве фактора вирулентности и связана с особенностями липополисахаридов клеточной стенки, их экранированием, особенностями организации наружной мембраны (для грамотрицательных бактерий), присутствием специализированных антикомплементарных белков на ней, также может быть расценена как антикомплементарная активность (Taylor, 1988).

О способности золотистых стафилококков разрушать комплемент известно из работ Р. Lew с соавторами (1979). Эта способность к деградации комплемента оказалась возможной при наличии у золотистых стафилококков внеклеточной протеазы (Bhakdi, 1985). Антикомплементарная активность была обнаружена у *C. l. hystolyticum* (Goldlust., 1968) и *P. Aeruginosa* (Vaca Pacheco., 1988), которые продуцировали протеолитические ферменты, разрушающие белки системы комплемента. Ю.А Брудастов (1992), изучавший антикомплементарную активность бактерий, выявил наличие этого признака у стафилококков, кишечных палочек и клебсиелл. Распространение изучаемого признака, как и его величина, нарастали в ряду окружающей среда – бактерионосители – больные. Отмечено повышение антикомплементарной активности в популяциях золотистых стафилококков при экспериментальной инфекции на мышах, обусловленное накоплением клонов, обладающих изучаемым свойством, в том числе и более выраженным. Показано, что штаммы стафилококков, выделенные от больных с затянувшимся гнойно-воспалительным процессом, чаще обладали способностью инактивировать комплемент (Дерябин и др., 1996). При определении антикомплементарной активности у штаммов золотистых и эпидермальных стафилококков, выделенных от резидентных и транзиторных бактерионосителей, установлена высокая частота распространения с высоким уровнем выраженности признака у штаммов, выделенных от резидентных бактерионосителей (Матюшина, 1996). Последующее изучение антикомплементарной активности у стафилококков выявило высокую частоту ее распространения у золотистых стафилококков (89,4%) по сравнению с эпидермальными (2,9%), что позволило рекомендовать этот тест в качестве дополнительного дифференцирующего признака среди представителей рода *Staphylococcus* (Бухарин и др. 1992). Описана антикомплементарная активность у гококков (Ахунова и др. 1997).

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Устройство микробиологической лаборатории».

2.1.1 Цель работы: Изучить правила работы в микробиологической лаборатории.

2.1.2 Задачи работы:

1. Изучить правила работы в микробиологической лаборатории.
2. Познакомиться с оборудованием, посудой и инструментами для работы с культурами микроорганизмов.
3. Освоить правила работы с культурами микроорганизмов.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Бактериологические боксы, термостат, холодильник, шпатели Дригальского, бактериологическая петля, микологические крючки, колбы, чашки Петри, пипетки Пастера

2.1.4 Описание (ход) работы:

Правила работы в микробиологической лаборатории

Работа в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения чистоты и порядка для обеспечения стерильности исследований и во избежание загрязнений культур микроорганизмов.

В микробиологической лаборатории ежедневно проводят влажную уборку, производят дезинфекцию воздуха путем проветривания (30-60 мин.) и облучения ультрафиолетовыми лучами от 30 минут до нескольких часов в зависимости от степени загрязненности воздуха. Пол, стены и мебель в микробиологической лаборатории протирают растворами различных дезинфицирующих веществ (2-3 % раствором соды, 3-5 % раствором фенола, 0,3 % водным раствором хлорамина).

Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, требует особенно тщательной обработки. Рабочий стол следует дезинфицировать до начала и после окончания работы (70 % раствором этилового спирта, 0,5-3 % водным раствором хлорамина).

При работе в микробиологической лаборатории необходимо соблюдать следующие правила:

1. Работу производить только в халатах и сменной обуви.
2. В лаборатории запрещается курение, прием пищи.
3. На рабочем месте не должно быть посторонних предметов; все реактивы, растворы, микробиологическая посуда с питательными средами и культурами микроорганизмов должны быть подписаны.
4. Все предметы, использованные при работе с живыми микроорганизмами, должны быть обеззаражены, либо обжиганием в пламени (петли, крючки, пинцеты), либо погружением в дезинфицирующий раствор (3-5 % водный раствор фенола или 2 % раствор хлорамина) (стеклянные пипетки, шпатели).
5. В конце занятия студент должен привести в порядок рабочее место, тщательно вымыть руки.

Оборудование, посуда и инструменты для работы с культурами микроорганизмов

В микробиологической лаборатории используется следующее оборудование: термостат, где с помощью терморегуляторов поддерживается постоянная для роста микроорганизмов температура; качалки и ферментеры для культивирования микроорганизмов; сушильные шкафы и автоклавы для стерилизации питательных сред, посуды и инструментов; бактерицидные лампы для дезинфекции помещений, ламинарные боксы, микроскопы и т.д.

Для культивирования микроорганизмов используется следующая стеклянная посуда: качалочные колбы, конические колбы, чашки Петри, пробирки, матрасы (рис. 1).

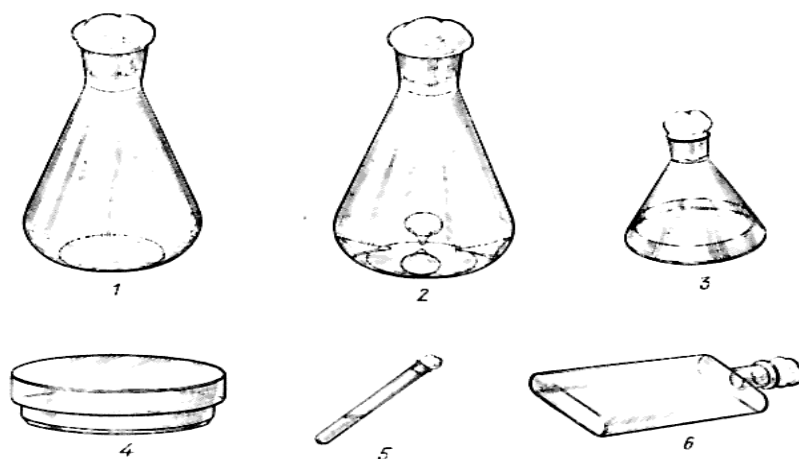


Рис 1. Посуда для культивирования микроорганизмов: 1- качалочная колба; 2- качалочная колба с отбойниками; 3- коническая колба; 4- чашка Петри; 5- пробирка; 6- матрасс.

В качестве инструментов для посева и приготовления препаратов используют бактериологические петли, иглы, крючки, стеклянные пипетки, шпатели Дригальского.

Правила работы с культурами микроорганизмов

В лаборатории микроорганизмы выращивают на жидких и плотных питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы, чашки Петри. Посуду и питательные среды предварительно стерилизуют. Процесс выращивания микроорганизмов в искусственных условиях в питательной среде называется культивированием. При этом выращенные клетки определенного вида микроорганизмов называются культурой микроорганизмов.

Все действия следует проводить около пламени горелки (но не в пламени) и по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не рекомендуется делать резких движений и ходить около работающего с чистой культурой, т.к. движение воздуха увеличивает вероятность случайного ее загрязнения. Для разлива питательной среды в чашки Петри сосуд со средой берут в правую руку, вынимают из него пробку, зажимая ее мизинцем и безымянным пальцем левой руки, обжигают горло сосуда в пламени горелки и, приоткрыв большим и указательным пальцами левой руки крышку чашки Петри, быстро наливают в чашку расплавленную среду в таком количестве (около 20 мл), чтобы дно чашки было полностью покрыто. Крышку тотчас закрывают и чашку оставляют на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда.

Внесение клеток микроорганизмов в стерильную среду называется посевом. Распределение микроорганизмов по поверхности питательной среды называют рассевом. Перенос уже выращенных микроорганизмов из одной среды в другую – пересевом. Клетки микроорганизмов для посева или приготовления препаратов берут бактериологической петлей (если микроорганизмы выращены на плотной питательной среде) или стерильной пипеткой (если микроорганизмы выращены в жидкой среде). Перед взятием клеток микроорганизмов петлю стерилизуют, обжигая саму петлю и часть держателя в пламени спиртовки. Сразу же после стерилизации петлю вводят в сосуд с микроорганизмами. Чтобы не повредить клетки микроорганизмов, петлю вначале охлаждают, прикасаясь ею к внутренней поверхности сосуда или к питательной среде, свободной от клеток микроорганизмов, и только после этого захватывают небольшое количество микробной массы.

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: «Методы стерилизации».

2.2.1 Цель работы: Изучить физические и химические методы стерилизации.

2.2.2 Задачи работы: Изучить физические и химические методы стерилизации.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Колбы, пробирки, чашки Петри, вата, марля, нитки, ножницы, сухожаровой шкаф, автоклав.

2.2.4 Описание (ход) работы:

Стерилизация (лат. *sterilis* — бесплодный) — обеспложивание; уничтожение в каком-либо материале патогенных и непатогенных микроорганизмов в вегетативной и споровой формах. Для стерилизации используют физические и химические методы. Механизмы их действия неодинаковы, но при выборе любого из методов должны быть соблюдены два основных требования: достижение полного обеспложивания и сохранение физико-химических свойств стерилизуемого материала.

Физические методы стерилизации. Методы заключаются в уничтожении микроорганизмов с помощью физических средств. К ним относят: стерилизацию сухим жаром, влажным жаром, фильтрованием, ультрафиолетовыми лучами, ультразвуком.

Микробиологи стерилизуют питательные среды, посуду, инструменты с целью не допустить развития посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах. Различают термическую и холодную стерилизацию. Существуют следующие способы термической стерилизации: прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация (горячим воздухом), стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробная стерилизация (тиндализация), кипячение. К методам холодной стерилизации относят стерилизацию фильтрованием (пропускание жидкостей через специальные мелкопористые фильтры, называемые бактериальными), ультрафиолетовыми лучами, ионизирующим излучением, растворами и газообразными средствами. Дробная стерилизация применяется для стерилизации сред, портящихся под действием температур выше 100°C, она заключается в многократном прогревании сред без избыточного

давления. Пастеризация- однократный прогрев материала при температуре ниже 100°C (15-30 минут при 60-70 °C, 10-15 минут при 80°C).

Для стерилизации посуды обычно используются сухожаровые шкафы, а для стерилизации питательных сред автоклавы, которые отличаются объемом внутренней камеры и способом загрузки (вертикальная и горизонтальная). Современное оборудование может работать в автоматическом режиме и снабжено микропроцессорным управлением.

Химические методы стерилизации. Сводятся в лабораторной практике к консервированию питательных сред, вакцин, а также лечебных и диагностических сывороток различными химическими соединениями (соли металлов, щелочи, антибиотики и др.) с целью предупреждения бактериального загрязнения. Питательные среды консервируют хлороформом, толуолом, иногда эфиром (для освобождения от консерванта среду нагревают до 56 °C). Вакцины и лечебные сыворотки консервируют 0,25...0,5%-м раствором фенола, 0,5%-м раствором хлороформа, 0,5%-м раствором формалина или раствором мертиолата (в конечном разведении 1 : 5000 - 1:10 000).

Работа 1.

Задание

1. Познакомиться с устройством и принципом работы автоклава (рис.).

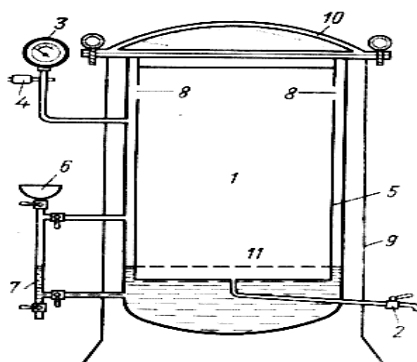


Рис. Схема автоклава

1. стерилизационная камера; 2. кран для выхода воздуха; 3. манометр; 4. предохранительный клапан; 5. водопаровая камера; 6. воронка для заполнения автоклава водой; 7. водомерная трубка; 8. отверстие для поступления пара в стерилизационную камеру; 9. защитный кожух; 10. крышка автоклава; 11. подставка для размещения посуды.

Работа 2.

Задание. Подготовить для стерилизации пробирки и колбы с ватно-марлевыми пробками. Для приготовления пробок плоский кусок ваты, взятый вдоль волокна, скатать валиком, обернуть марлевой салфеткой. Длина обычной пробки должна быть около 4 см. Пробка должна входить в пробирку на 1,5-2 см. Для сохранения формы, пробку вынимают из горлышка, слегка вращая. Перед стерилизацией пробки прикрыть бумажными колпачками.

Работа 3.

Задание. Простерилизовать подготовленную посуду и инструменты в сухожаровом шкафу при 160°C 2 часа. По окончании стерилизации шкаф не открывать до тех пор, пока температура в нем не упадет до 80°C, так как при резком охлаждении может нарушиться стерильность материала, а сильно нагретое стекло может потрескаться.

Контрольные вопросы: 1. Стерилизация питательных сред. 2. Подготовка сред к стерилизации. 3. Методы стерилизации питательных сред. 4. Устройство и принцип работы автоклава. 5. Выбор режима автоклавирования в зависимости от состава и pH среды, от объема стерилизуемого субстрата, от толщины стенок и формы емкостей. 6. Дробная стерилизация. 7. Пастеризация. 8. Стерилизация фильтрованием. 9. Стерилизация стеклянной посуды, стерилизация инструментов и приборов.

2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

Тема: «Простая и сложная окраска микропрепаратов из чистой культуры».

2.3.1 Цель работы: Изучить методы приготовления микропрепаратов.

2.3.2 Задачи работы:

1. Овладеть методами приготовления микропрепаратов
2. Освоить простой метод окраски микропрепаратов
3. Освоить сложный метод окраски микропрепаратов

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Предметные стекла, бактериологические петли, спиртовки, взвесь бактерий в стерильном физ. растворе, микроскопы, иммерсионное масло, раствор метиленового синего, набор красителей для окраски по граммам, тушь.

2.3.4 Описание (ход) работы:

Работа 1.

Задание. Приготовить препараты живых клеток: «раздавленная капля» - грибов, висючая капля - подвижных бактерий, «отпечаток» - актиномицетов. Промикроскопировать препараты и зарисовать результат исследования.

Работа 2.

Задание. Приготовить микропрепарат из агаровой культуры.

Для приготовления мазка необходимо взять чистое обезжиренное стекло. На предметном стекле обозначают стеклогграфом место нанесения материала. На обратную сторону стекла от обозначенного места наносят петлей каплю физиологического раствора. В левую руку берут пробирку с агаровой культурой, а в правую - петлю за петледержатель. Петлю обжигают на пламени горелки. Пробку прижимают к ладони 4 и 5 пальцами и медленными вращающими движениями извлекают из пробирки. Край пробирки обжигают. Петлю вводят в пробирку и остужают о стенки. Скользящим движением петлей берут материал и осторожно, не задевая о стенки, извлекают. Пробирку снова обжигают и закрывают пробкой.

В каплю физиологического раствора вносят исследуемую культуру и смешивают петлей до образования слегка мутноватой взвеси. Полученную взвесь равномерно распределяют на поверхности стекла, чтобы диаметр мазка был 1 – 1,5 см. Препарат высушивают на воздухе и фиксируют, для этого проводят стекло над пламенем горелки

три раза, при этом мазок должен быть сверху. Препарат окрашивают фуксином (1-2 мин) или метиленовой синькой (3-5 мин).

Для окраски негативным способом на стекло наносят каплю взвеси дрожжей в физиологическом растворе и смешивают с каплей туши. Препарат высушивают.

Окрашенные препараты рассматривают под микроскопом с использованием масляной иммерсии.

Заполнить таблицу.

Таблица

Позитивный метод окраски		Негативный метод окраски тушью (рис.)
Фуксином (рис.)	Метиленовым синим (рис.)	

Контрольные вопросы: 1. Какие красители наиболее часто используются для позитивной окраски микроорганизмов? 2. В чем преимущества негативной окраски микроорганизмов? 3. Правила обработки предметных и покровных стекол. 4. Как приготовить препараты живых клеток? 5. Правила приготовления препаратов фиксированных клеток. 6. Каковы цели и способы фиксации?

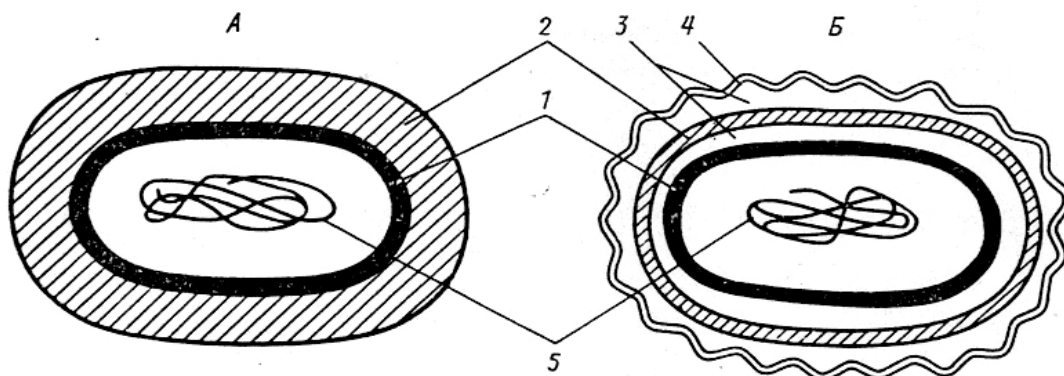
Сложные методы окраски бактерий

Окраска микроорганизмов по Граму.

В зависимости от химического состава и строения клеточной стенки прокариоты делятся на грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Основные отличия в строении клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий схематически изображены на рисунке 5.

Такое деление связано со способностью бактерий окрашиваться по Граму. Эта окраска является важным диагностическим признаком, она коррелирует со многими другими свойствами бактерий. Сущность окраски заключается в том, что при обработке клеток прокариот сначала красителем генциановым фиолетовым, а затем йодом, образуется окрашенный комплекс, который при последующей обработке спиртом удерживается грамположительными бактериями и вымывается из клеток грамотрицательных бактерий, которые в результате обесцвечиваются. При последующей обработке фуксином они приобретают розово-красную окраску, а грамположительные имеют сине-фиолетовую окраску.



Схематическое изображение клеточной стенки грамположительных (А) и грамотрицательных (Б) бактерий. 1- цитоплазматическая мембрана; 2- пептидогликан; 3- периплазматическое пространство; 4- наружная мембрана; 5-ДНК.

Приготовление препаратов бактерий, окрашенных по Граму, включает следующие этапы:

1. Приготовление мазка.
2. Фиксация препарата.
3. Окрашивание препарата генциановым фиолетовым (1-2 мин.).
4. Обработка раствором Люголя до почернения.
5. Обработка 96° этиловым спиртом (0.5-1 мин.).
6. Промывание препарата водой.
7. Окрашивание фуксином (1-2 мин.).
8. Промывание препарата водой.
9. Высушивание препарата.
10. Микроскопирование препарата с иммерсионной системой.

При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные — красный цвет фуксина.

Работа

Задание. Приготовить препарат из смеси грамположительных кокков и грамотрицательных палочек. Окрасить по методу Грама. Рассмотреть окрашенный препарат под микроскопом с иммерсией.

Заполнить таблицу.

Таблица

Исследуемый материал	Ингредиенты окраски по Граму и время их действия	Назначение основных ингредиентов	Результат (рисунок с обозначениями)

Контрольные вопросы: 1. Строение и химический состав клеточной стенки бактерий. 2. Основные отличия грамположительных и грамотрицательных бактерий. 3. Сущность окраски по Граму.

2.4 Лабораторное занятие №4 (2 часа)

Тема: «Экспериментальное заражение лабораторных животных. Правила вскрытия и бактериологического исследования трупов лабораторных животных».

2.4.1 Цель работы: 1. Изучить методы заражения лабораторных животных. 2. Ознакомиться с методами определения факторов патогенности микроорганизмов. 3. Ознакомиться с правилами бактериологического исследования трупов лабораторных животных

2.4.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Чашки Петри с кровяным агаром, пробирки с плазмой крови, бактериологические петли, термостат, микробные культуры, лабораторные животные, клетки для животных, шприцы инсулиновые, спиртовые тампоны, кюветы, горелки спиртовые, ватки, пинцеты, корцанги, фарфоровые ступки, термостат, спиртовые тампоны, кюветы, горелки спиртовые, пинцеты, скальпели, ножницы, шпатели металлические, пастеровские пипетки, пробирки с МПА и МПБ

2.4.3 Описание (ход) работы:

Определение вирулентности и токсигенности микроорганизмов

В повседневной диагностической практике обычно ограничиваются установлением факта патогенности микроорганизма; при оценке биопрепаратов необходимы количественные характеристики вирулентности микроорганизма, взятого для заражения животного.

Вирулентность (токсигенность) микроба измеряют в специальных условных единицах: абсолютная летальная доза (Dcl — *dosis certae letalis*) вызывает гибель 100 % зараженных животных; 50%-я летальная доза (LD50) — 50 % зараженных животных; 50%-я инфицирующая доза (ID50) вызывает заболевание 50% зараженных животных. LD50 и ID50 —наиболее точные показатели, поскольку отражают чувствительность к возбудителю (токсину) большинства взятых в опыт животных, а Del показывает чувствительность наиболее устойчивых особей.

Для расчета LD50 исследуемой культуры микроорганизма используют один из приведенных методов. Готовят суспензию бактерий с известным содержанием микробных клеток в единице объема. Затем делают последовательные (2, 5, 10-кратные) разведения суспензии на стерильном физиологическом растворе и равные объемы каждого разведения вводят (подкожно, внутрибрюшинно и т. д.) чувствительным лабораторным животным. Если определяют летальный эффект, то учитывают количество погибших животных и рассчитывают LD50. Поскольку обычно ни одна из доз возбудителя не приводит к гибели строго 50 % зараженных животных, LD50 определяют статистическими методами.

Биологический метод исследования

Методы исследования, связанные с заражением животных, называются биологическим или биопробой. Используемые для этой цели животные называются лабораторными или экспериментальными. Наиболее широко используют кроликов, морских свинок, белых мышей, крыс, голубей, цыплят.

Экспериментальное заражение лабораторных животных проводится с разной целью: определение патогенности и вирулентности микробов, токсичности и токсигенности их, выделение чистой культуры из патматериала, определение активности и безвредности приготовленных вакцин и т.д.

Способы заражения лабораторных животных

В зависимости от цели исследования и предполагаемого возбудителя выбирают восприимчивое лабораторное животное и подбирают способ его заражения.

Взвесь микробной культуры или суспензию из зараженных органов осторожно набирают в шприц, после чего конец иглы осторожно закрывают комочком ваты, смоченным 5% раствором хлорамина или спиртом. Повернув шприц иглой вверх, осторожно выпускают из него пузырьки воздуха. Загрязненную вату бросают в банку с дезраствором.

Внутрикожный способ применяется редко. Материал вводят тонкой иглой непосредственно в кожу области спины или живота в дозе 0,1-0,2 мл. чаще всего используют для обнаружения некротоксина (у стафилококков, у листерий и др.).

Подкожный способ заражения применяется при многих заболеваниях. Кожу животного захватывают пальцами и образовавшуюся складку прокалывают иглой шприца, материал вводят медленно. Затем опускают складку, на иглу накладывают вату, смоченную дезраствором и быстро извлекают иглу. Наиболее часто подкожно заражают в область спины, крестца и живота. Доза в зависимости от вида микроба.

Внутримышечный способ – материал вводят в толщу мускулатуры обычно в области бедра, а птицам в грудную мышцу.

Внутрибрюшинный способ применяется часто. Животное фиксируют головой вниз, чтобы внутренние органы опустились к диафрагме. Материал вводят в задней части живота и прокалывают ее под острым углом, затем, повернув шприц под прямым углом, толчком прокалывают брюшную стенку при этом ощущается как бы провал иглы в полость живота.

Внутривенное заражение чаще всего проводят для выявления токсинов у микробов (при ботулизме, при энтеротоксемии). Кроликам материал вводят в краевую вену уха. Рукой сдавливают вену ближе у основания уха, вследствие чего вена лучше наполняется. Тонкой иглой прокалывают кожу и вену, иглу вводят по направлению к корню уха. Затем отнимают пальцы, сдавливающие вену, и медленно инъецируют материал. По окончании иглу прижимают ватой, пропитанной дезраствором, и вынимают. Мышам и крысам материал вводят в боковую вену хвоста, курам и голубям в подкрыльцовую вену.

Очень редко используют заражение через дыхательные пути, в пищеварительный тракт и в переднюю камеру глаза. Место введения в организм материала во всех случаях необходимо обработать, чтобы не внести в организм микробы, имеющиеся на коже животного. Для этого выстригают шерсть на месте введения, кожу протирают дезраствором. После введения материала кожу вновь протирают дезраствором.

Всех зараженных животных отмечают краской, сведения о заражении записывают в журнал. Кроликов помещают в клетки, морских свинок и мышей – в металлические биксы, наклеивают этикетки на которых указывают сведения о заражении.

Вскрытие трупов лабораторных животных

Вскрытие трупов производят стерильными инструментами в боксе с соблюдением правил асептики. Вскрывать необходимо свежие трупы сразу после гибели, или усыпив животных эфиром, так как в ближайшие часы после смерти проницаемость тканей нарушается и микробы из одного органа могут проникнуть в другой.

Труп животного фиксируют брюшком вверх на деревянной доске или на пластинке застывшего парафина с помощью препаровальных игл. Кожно-шерстный покров дезинфицируют дезраствором. Сначала исследуют кожу, подкожную клетчатку, затем проводят вскрытие, делают посевы и мазки из органов грудной полости и в последнюю очередь из брюшной полости. При вскрытии обращают внимание на патологоанатомическую картину.

Посевы из сердца или паренхиматозных органов после прижигания их делают пастеровской пипеткой в МПБ и в МПА. Из крови и из органов готовят мазки, окрашивают, микроскопируют. После окончания работы трупы сжигают. При хранении их до момента сжигания трупы засыпают хлорной известью или заливают дезрастворами: 5% фенолом или 5% раствором хлорамина.

Работа 1.

Задание. Освоить методы заражения белых мышей.

Заклучение о патогенности микроорганизма делают как по результатам биопробы (прямое доказательство), так и по ряду признаков, косвенно свидетельствующих о патогенных свойствах выделенного микроба. Наиболее часто применяют следующие тесты.

Тест на плазмокоагулазу. Коагулаза — фермент бактерий (стафилококков), который в сочетании с некоторыми компонентами сыворотки коагулирует плазму. Благодаря коагулазе вокруг стафилококковых поражений образуется фибринозный барьер, облегчающий персистенцию бактерий в тканях, кроме того, отложения фибрина на поверхности бактериальных клеток затрудняют их фагоцитоз.

Тест на гиалуронидазу. Гиалуронидаза — фермент, расщепляющий гиалуроновую кислоту и, как следствие, деполимеризующий межклеточное вещество. Рассматривают как фактор инвазивности бактерий. Получение гиалуронового субстрата (из пупочных канатиков) — довольно сложная процедура. На практике удобнее использовать тест декапсуляции бактерий. В качестве субстрата в этом случае берут культуры бактерий, в капсульном веществе которых есть гиалуроновая кислота (*P. multocida* серовар А, *S. equi*).

На поверхность агара в чашке Петри дробно засевают культуру *P. multocida* или *S. equi*. Затем в виде линии высевают на поверхность среды культуру микроорганизма, у которого выявляют способность к синтезу гиалуронидазы. Чашки с посевами инкубируют при 37 °С 16...24 ч. Если исследуемый микроорганизм выделяет гиалуронидазу, то она диффундирует в толщу питательной среды и разрушает капсулу тест-микроба. При анализе посевов в косопроходящем пучке света колонии *S. equi* (*P. multocida*) вблизи «штриха» исследуемой культуры меньше по размеру, серого или голубого цвета в отличие от флуоресцирующих отдаленных колоний.

Тест на гемолизин. Бактериальные гемолизины — обширная группа веществ-мембранотоксинов, которые вызывают нарушение целостности мембраны эритроцитов и их лизис.

Тест на лецитиназу. Лецитиназа расщепляет гидролизом лецитин.

Работа 2.

Задание. Определить наличие плазмокоагулазы у культуры *S. aureus*.

Петлю бактериальной массы исследуемой культуры, снятой с поверхности агаровой среды, смешивают с 0,5 мл плазмы крови кролика (человека), не разведенной или разведенной стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:4, инкубируют при 37 °С, результаты учитывают через 4 и 24 ч. Положительная реакция — образование сгустка.

Работа 3.

Задание. Определить наличие гемолитической активности у культуры микроорганизмов.

Исследуемую культуру уколом или дробно засевают в чашки Петри с 5%-м кровяным агаром, посеvy инкубируют при 37°С 24 ч. Гемолизин, выделяемый растущей культурой бактерий, диффундирует в толщу агара и вызывает лизис эритроцитов, что проявляется в виде светлой (бета-гемолиз) или полупрозрачной (альфа-гемолиз) зоны вокруг колоний. Гемолитическую активность микроорганизма можно также определять его посевом в 1 ...5%-й кровяной бульон, который после культивирования выделяющего гемолизин микроба становится прозрачным за счет лизиса эритроцитов.

Работа 4.

Задание. Определить наличие лецитиназной активности у культуры *B. cereus*.

Исследуемую культуру засевают дробно на желточный агар, культивируют при 37-38 °С 24-48 ч. Положительный результат — появление зоны помутнения вокруг колоний.

Работа 5.

Задание. Вскрыть труп лабораторного животного, провести его бактериологическое исследование. Через сутки провести учет посевов, сделать заключение, заполнить таблицу.

Таблица

Органы, из которых сделан посев	Наличие роста

Контрольные вопросы: 1. Какими методами заражают лабораторных животных? 2. Как определяется вирулентность микроорганизмов? 3. Метод выявления гемолитической активности микроорганизмов. 4. Метод выявления плазмокоагулазы. 5. Методы выявления лецитиназы. 6. Факторы вирулентности. 7. Как правильно проводить бактериологическое исследование трупа лабораторного животного? 8. Как происходит утилизация вскрытых трупов лабораторных животных?

2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).

Тема: «Этапы постановки ПЦР. Учет результатов».

2.5.1 Цель работы: ознакомиться с этапами постановки полимеразной цепной реакции

2.5.2 Задачи работы:

1. изучить этапы ПЦР
2. освоить учет результатов ПЦР

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: Оборудование для постановки ПЦР, наглядные материалы для учета реакции ПЦР.

2.5.4 Описание (ход) работы:

В 1983 г. К.Б. Мюллис и др. опубликовали и запатентовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), за что автору была присуждена Нобелевская премия по химии.

В начале использования метода после каждого цикла нагревания-охлаждения приходилось добавлять в реакционную смесь ДНК-полимеразу, так как она инактивировалась при высокой температуре, необходимой для разделения цепей спирали ДНК. Процедура проведения реакции была сравнительно неэффективной, требовала много времени и фермента.

В 1986 году метод полимеразной цепной реакции был существенно улучшен. Было предложено использовать ДНК-полимеразы из термофильных бактерий. Эти

ферменты оказались термостабильными и были способны выдерживать множество циклов реакции. Их использование позволило упростить и автоматизировать проведение ПЦР. **Одна из первых термостабильных ДНК-полимераз была выделена из бактерий *Thermus aquaticus*** - палочковидная экстремально термофильная бактерия рода *Thermus*. Обитает в горячих источниках, гейзерах при температурах намного выше 55⁰. Впервые открыта Томасом Броком и Хадсоном Фризом в районе Больших Фонтанов Йеллоустонского национального парка и названа *Taq*-полимеразой.

Принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) был разработан Кэрри Мюллисом в 1983 году.

За разработку ПЦР-анализа К.Мюллис в 1993 году был удостоен Нобелевской премии в области химии.

Появление ПЦР было обусловлено определенными достижениями в области молекулярной генетики - **расшифровкой нуклеотидной последовательности геномов** ряда микроорганизмов.

ПЦР стала возможной благодаря открытию уникального фермента **taq-ДНК-полимеразы** - Особенность этого фермента заключается в его термостойкости и высокой рабочей температуре – оптимум работы 72 С.

Принцип метода полимеразной цепной реакции

ПЦР – метод амплификации ДНК *in vitro*, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определённую последовательность ДНК в миллиарды раз. Возможность получения огромного количества копий одного строго определённого участка генома значительно упрощает исследование имеющегося образца ДНК.

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:

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

Открытие термостабильной ДНК-полимеразы (*Taq*-полимеразы) позволило сделать процесс репликации ДНК циклическим и использовать его для работы *in vitro*.

Создание программируемых термостатов (амплификаторов), которые по заданной программе осуществляют циклическую смену температур, создало предпосылки для широкого внедрения метода ПЦР в практику лабораторной клинической диагностики.

При многократном повторении циклов синтеза происходит экспоненциальное увеличение числа копий специфического фрагмента ДНК, что позволяет из небольшого количества анализируемого материала, который может содержать единичные клетки микроорганизмов получить достаточное количество ДНК копий для идентификации их методом электрофореza.

Комплементарное достраивание цепи начинается в определенных стартовых блоках – **коротких двунитевых участках**. При присоединении таких блоков к специфическим участкам ДНК можно направить процесс синтеза новой цепи только в этом участке, а не по всей длине ДНК цепи.

Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют две олигонуклеотидные затравки (20 нуклеотидных пар) - **праймеры**. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними.

Для получения достаточного количества копий искомого характеристического фрагмента ДНК амплификация включает несколько (20-40) циклов.

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

Для проведения амплификации необходимы следующие компоненты:



- **ДНК-матрица** (ДНК или ее часть, содержащая искомым специфический фрагмент);
- **Праймеры**, 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;
- **Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов** (дНТФ) (смесь четырех дНТФ, являющихся материалом для синтеза новых комплементарных цепей ДНК);
- **Фермент Taq-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).

Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, протекающих в различных температурных режимах:

1 этап: Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали). Протекает при 93-95 градусах в 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 градусов. Время отжига -20-60 сек.

3 этап: Достраивание цепей ДНК. Комплементарное достраивание 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 (Taq-полимеразой) и проходит при температуре 70-72 градусов. 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. Поэтому, даже если в исходном растворе первоначально находилась только одна двуцепочечная молекула ДНК, то за 30-40 циклов в растворе накапливается около 108 молекул ампликона. Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции этого фрагмента методом электрофореза в агарозном геле.

Преимущества метода ПЦР как метода диагностики инфекционных заболеваний

1. Прямое определение наличия возбудителей.

Выявление специфического участка ДНК возбудителя методом ПЦР дает прямое указание на присутствие возбудителя инфекции.

2. Высокая специфичность.

В исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов.

3. Высокая чувствительность

Метод ПЦР позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. В течение нескольких часов с помощью ПЦР из одного фрагмента молекулы ДНК можно получить более 50 млрд. идентичных молекул. Чувствительность ПЦР-анализа составляет 10-100 клеток в пробе.

4. Универсальность процедуры выявления различных возбудителей

Метод основан на выявлении фрагмента ДНК или РНК, являющегося специфичным для конкретного организма. Сходство химического состава всех нуклеиновых кислот позволяет применять унифицированные методы проведения лабораторных исследований. Это дает возможность диагностировать несколько возбудителей из одной биопробы.

5. Высокая скорость получения результата анализа

Для проведения ПЦР-анализа не требуется выделение и выращивание культуры возбудителя. Унифицированный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции, и автоматизация процесса амплификации дают возможность провести полный анализ за 4-4.5 часа.

6. Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций.

Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих форм микроорганизмов. Применение ПЦР-диагностики также очень эффективно в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов.

Методом ПЦР возможно выявление возбудителей не только в клиническом материале, полученном от больного, но и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва и т.д.). Простые требования к условиям хранения транспортировки

материала от пациента в лабораторию не требуют сохранения возбудителя в живом виде, по сравнению с бактериологическими и вирусологическими методами.

Ограничения метода ПЦР

- перекрестная контаминация от пробы к пробе, приводящая к появлению спорадических ложноположительных результатов;
- контаминация продуктами амплификации (ампликонами), имеющая наибольшее значение, т.к. в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в огромных количествах и являются идеальными продуктами для реамплификации.

ПЦР – исследование включает в себя 3 стадии:

- выделение ДНК из образцов;
- проведение полимеразной цепной реакции;
- регистрация результатов (методом электрофореза в агарозном геле)

Необходимо территориально разделить различные стадии проведения анализа, размещая их в отдельных помещениях:

Пре-ПЦР-помещение - обработка клинических образцов, выделение ДНК, приготовление реакционной смеси для ПЦР и постановка ПЦР. В этих помещениях запрещается проводить все другие виды работ с инфекционными агентами, ПЦР-диагностика которых проводится в данной лаборатории.

Пост-ПЦР-помещение - детекция продуктов амплификации. В этом помещении допускается использовать другие методы детекции инфекций.

Работа 1

Задание: Зарисовать схему постановки и учета полимеразной цепной реакции.

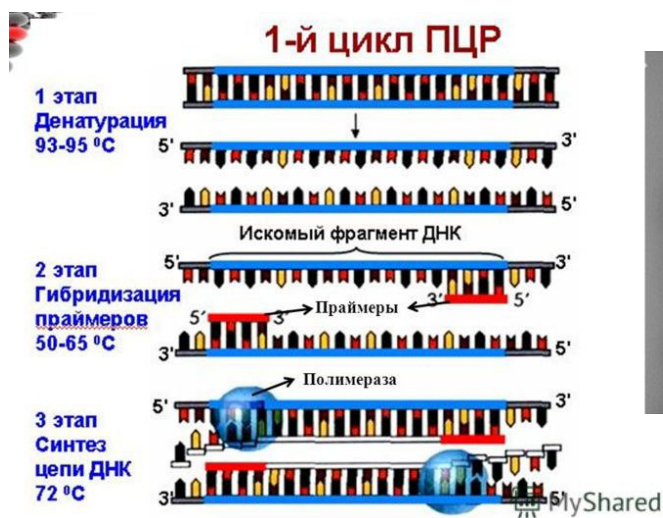


рис. Схема ПЦР

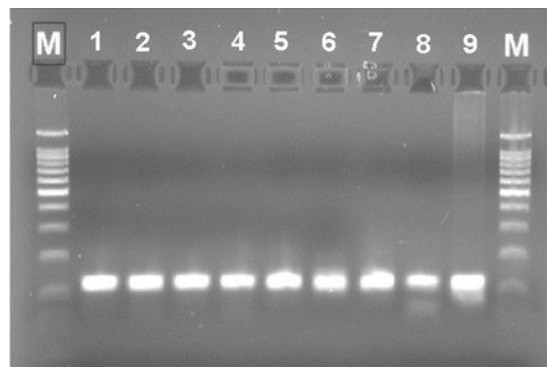


рис. Электрофорез

Контрольные вопросы: 1. История открытия ПЦР. 2. Этапы постановки ПЦР. 3. ингредиенты реакции ПЦР. 4. Учет результатов постановки ПЦР. 5. Преимущества использования ПЦР в микробиологии. 6. Недостатки использования ПЦР в микробиологии.

2.6 Лабораторная работа №6 (2 часа)

Тема «Иммуноферментный анализ (ИФА)»

2.6.1 Цель работы: 1. Рассмотреть сущность иммуноферментного анализа. 2. Изучить сферы применения ИФА в лабораторной практике. 3. Ознакомиться с ходом анализа.

2.6.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Спектрофотометр STAT FAX 2100, промывочное устройство, термостатируемый шейкер, многоканальные дозаторы, наборы реагентов «Вектор-Бест».

2.6.3 Описание (ход) работы:

Иммуноферментный анализ используется в двух целях: при необходимости определить наличие антигенов возбудителя какой-либо инфекции, либо (что практикуется гораздо чаще) для установления присутствия антител класса IgA, IgM, IgG к антигену возбудителя болезни.

Принцип иммуноферментного анализа базируется на иммунной реакции антигена с антителами, когда, присоединяя к антителам ферментную метку, исследователь определяет результаты реакции антитело-антиген, фиксируя появление, либо изменение уровня ферментативной активности.

Первая реакция наблюдается между очищенным антигеном возбудителей (Ag) и устанавливаемым Ig (Ab) путем фиксирования к плоскости лунок планшета иммунолога.

Вторая иммунологическая реакция проводится с целью выявления появившихся иммунных комплексов. В роли антигена здесь используют специфический связавшийся Ig, антителами же к нему применяют конъюгат – Ig (антииммуноглобулины) к определенному Ig человека, который метят ферментом (чаще пероксидазой). Происходящую за этим ферментативную реакцию катализирует ферментная часть молекулы конъюгата. В качестве субстрата реакции применяют не имеющее цвета вещество под названием хромоген, в процессе реакции хромоген приобретает окраску. По интенсивности окрашивания лунки определяют количество находящегося в пробе иммуноглобулина.

По завершению реакции проводится фотометрирование лунки, учет результатов ведут при помощи специального прибора. Математическая обработка результатов исследования показывает наличие и количество характерных антител в пробе.

Для серодиагностики используют 96-луночный полистирольный планшет, на боковых поверхностях ячеек которого заблаговременно адсорбируют антиген. При внесении исследуемой сыворотки в ячейки планшета к антигену прикрепляются гомологичные ему антитела. Затем в ячейки помещают меченные ферментом антитела против антител (иммуноглобулинов) человека. В случае, если исследуемая сыворотка содержит определяемые антитела - они проявятся как антигены, в реакцию с которыми вступят меченные антитела. Добавленный после промывки хромоген (краситель) позволит зафиксировать реакцию по характерному окрашиванию ячеек. Интенсивность такой окраски будет пропорциональна доле фермента, и, соответственно – количеству антител.

Измеряя оптическую плотность (ОП) находящейся в ячейке жидкости и сравнивая ее с шаблонным образцом, подсчитывают концентрацию антител на единицу объема.

Чаще всего результат подсчитывают в единицах ОП. Характерно, что каждая тест-система снабжена собственными показателями патологии и нормы, а также показателями учета результатов, которые и следует принимать во внимание, интерпретируя результаты.

ИФА обычно используют в гистохимическом (иммунопероксидазная реакция) и твердофазном вариантах.

Твердофазный ИФА. Применяют наиболее широко. В этом случае антитела или антигены фиксируют на нерастворимых носителях: микропанелях, стеклянных или нейлоновых шариках.

При различных вариантах реакции результаты учитывают инструментально или визуально.

Обнаружение антигена (антител) по схеме «сэндвич». Для обнаружении АТ в исследуемой сыворотке лунки полистироловых микропанелей, сенсibiliзируют специфическими для искомого антитела антигеном. Добавляют в лунки образцы сывороток, инкубируют в шейкере-инкубаторе при 37°C, отмывают лунки от несорбированных антител фосфатно-буферным раствором. Далее в лунки вносят конъюгат (меченые ферментом, чаще всего пероксидазой хрена, антивидовые моноклональные АТ); панели инкубируют при 37°C, затем их отмывают от несвязавшихся антител.

В лунки вносят субстрат (перекись водорода) и хромоген (чаще всего тетраметилбензидин - ТМБ) инкубируют в темноте при 20-22 °C 5-30 мин, при наличии иммунных комплексов в лунках наблюдается синее окрашивание.

Реакцию останавливают добавлением раствора серной кислоты (для пероксидазы), синее окрашивание меняется на желтое.

Учет результатов визуальный или спектрофотометрический.

Обнаружение антигенов основано на том же принципе, но твердофазный носитель сенсibiliзируют известным антителом, добавляют исследуемый материал, затем конъюгат. Вносят субстрат и по цветной реакции судят о наличии или отсутствии антигенов в исследуемом материале.

Работа.

Задание. Изучить технику постановки ИФА, пронаблюдав за ходом реакции, зарисовать схему. Заполнить таблицу.

Таблица

Проба сыворотки	Результат реакции

Контрольные вопросы: 1. Описать сущность ИФА. 2. Перечислить оборудование, необходимое для постановки реакции. 3. Как происходит учет результатов реакции?

2.7 Лабораторная работа №7 (2 часа)

Тема: «Метод флуоресцирующих антител (МФА)».

2.7.1 Цель работы: 1. Ознакомиться с принципом МФА и техникой постановки.

2.7.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Таблицы.

2.7.3 Описание (ход) работы:

Реакцию иммунофлуоресценции, предложил Кунс в 1942 году. Однако эта старая реакция получила в настоящее время "вторую жизнь" благодаря появлению гибридных технологий, позволяющих получать моноклональные антитела. Их применение позволило значительно увеличить ее чувствительность и специфичность. Популярность РИФ объясняется экономичностью, наличием широкого спектра диагностических наборов, быстротой получения ответа. Сегодня в этой реакции используются как поликлональные сыворотки, так и моноклональные антитела меченые флуоресцеина изотиоцианатом (ФИТЦ). Для уменьшения неспецифического свечения фона применяют обработку мазка бычьим сывороточным альбумином, меченным родамином или голубым Эванса. Это комплексный метод сочетает в себе серологическую реакцию, при которой происходит специфическое взаимодействие антигена и антитела с образованием иммунного комплекса, и микроскопическое исследование под люминесцентным микроскопом, с помощью которого этот комплекс обнаруживают.

Преимущество РИФ состоит в том, что с его помощью возможно за два-три часа серологически идентифицировать микроорганизм непосредственно в патологическом материале, без выделения в чистой культуре (экспресс-метод). РИФ применяют и для выявления антител в крови животных.

Приготовление препарата для РИФ. При выявлении возбудителя инфекции (антигена) на предметном стекле готовят мазки-отпечатки из органов или другого материала. Препарат подсушивают на воздухе и фиксируют ацетоном (5 мин), или этанолом (10.... 15 мин), или метанолом (5...10 мин). Препарат можно фиксировать и нагреванием, как при обычной световой микроскопии. Мазки-отпечатки из органов и тканей лучше обрабатывать охлажденным до -20 °С ацетоном 2...4 мин. В зависимости от конкретных задач окрашивание готовых препаратов люминесцирующими сыворотками проводят различными способами.

Прямая РИФ. Разработал Coons с соавт. (1950). На предметное стекло с фиксированным антигеном наносят каплю люминесцирующей иммунной сыворотки в рабочем разведении, содержащей антитела против искомого антигена. Чтобы избежать высыхания, препарат помещают во влажную камеру (чашку Петри) с фильтровальной бумагой, смоченной водой, и выдерживают в термостате при 37-38 °С 15-30 мин. Затем препарат 5-10 мин промывают от несвязавшихся иммуноглобулинов проточной (водопроводной) водой с рН не ниже 7,0. Промытый препарат высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Прямая РИФ используют только для идентификации неизвестного антигена; к его недостатку относят необходимость приготовления люминесцирующей сыворотки для каждого вида идентифицируемого микроорганизма.

Непрямая РИФ. Применяют в двух вариантах.

Двухступенчатая РИФ - предложили Weller и Coons (1954). Этот вариант считают более универсальным, так как при помощи одной люминесцирующей антивидовой сыворотки можно выявлять различные виды микроорганизмов.

На антиген наносят каплю немеченной иммунной сыворотки (сыворотка первой ступени). Препарат выдерживают в термостате 15-30 мин, затем его промывают, чтобы удалить несвязавшиеся антитела иммунной сыворотки, и просушивают (см. прямой вариант). Если антитела сыворотки первой ступени соответствуют антигену, то вода не вымывает образовавшийся АГ-АТ-комплекс (антитела зафиксированы на антигене).

На подсушенный препарат наносят каплю люминесцирующей антивидовой сыворотки (сыворотка второй ступени) в рабочем титре. Препарат повторно помещают в термостат во влажной камере на 15-30 мин, затем промывают водой и подсушивают. Антивидовая сыворотка представляет собой меченные флуорохромом антитела против иммуноглобулинов крови животного того вида, от которого получена иммунная сыворотка первой ступени. Таким образом, антитела первой сыворотки служат антигеном для меченых антител антивидовой сыворотки. В результате к образовавшемуся на первом этапе АГ—АТ-комплексу присоединяются антитела второй ступени, образуется двойной комплекс, который можно обнаружить в люминесцентном микроскопе.

Универсальность непрямого варианта обусловлена тем, что, используя на первом этапе полученные от животных одного вида (например, от лошадей) иммунные сыворотки против различных микроорганизмов, на втором этапе с помощью одной антивидовой сыворотки можно идентифицировать неограниченное количество возбудителей инфекционных болезней.

Трехступенчатая РИФ представляет собой вариант РСК на стекле. В данном случае в иммунном комплексе на стекле при помощи люминесцирующей сыворотки выявляют связанный комплемент.

Наибольшее распространение получили наборы, основанные на прямой реакции иммунофлуоресценции (ПИФ), однако имеются тест-системы, использующие реакцию непрямо́й иммунофлуоресценции

Оценка результатов РИФ. Учитывают яркость свечения, цвет, локализацию и структуру свечения. Интенсивность свечения оценивают по четырехкрестовой системе: 1) (++++) - очень яркая флуоресценция по периферии микробной клетки, четко контрастирующая с темной центральной частью клетки; 2) (+++) - яркая флуоресценция периферии клетки; 3) (++) - слабое свечение периферии клетки; 4) (+) - нет контрастного свечения периферии и центральной части микробной клетки. Отсутствие специфического свечения обозначают знаком «минус» (видны тени микроорганизмов). При диагностике различных возбудителей болезней положительным результатом чаще считают специфическое свечение бактериальных клеток не ниже, чем на четыре или три креста.

Работа.

Задание. Освоить технику постановки реакции иммунофлуоресценции для выявления *S. aureus* в исследуемом материале. Учесть результат и зарисовать схему постановки реакции в тетрадь.

Контрольные вопросы: 1. В чем сущность одноступенчатой, двухступенчатой и трехступенчатой РИФ? 2. Для каких целей используют РИФ?

2.8 Лабораторная работа №8 (2 часа).

Тема: «Методы исследования персистентных характеристик микроорганизмов».

2.8.1 Цель работы: Изучить методы определения персистентных характеристик микроорганизмов.

2.8.2 Задачи работы:

1. Изучить метод определения антилизоцимной активности
2. Изучить метод определения антикарнозиновой активности
3. Изучить метод определения антилактоферриновой активности
4. Изучить метод определения антикомплементарной активности
5. Изучить метод определения IgA-протеазной активности

2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Чашки Петри с питательной средой, культуры микроорганизмов, термостат, холодильник, планшеты, бактериальная суспензия, фотометр.

2.8.4 Описание (ход) работы:

Антилизоцимная активность (Бухарин, Усвятцов, 1982) - способность микроорганизмов инактивировать лизоцим.

Антилизоцимная активность в 88-100% встречается у грамотрицательных микроорганизмов как палочковидных, так и кокковых форм (шигеллы, сальмонеллы, кишечные палочки, иерсинии, гонококки, менингококки, пневмококки и др.), у грамположительных кокков (стафилококки, стрептококки) антилизоцимный признак является значительно реже (Усвятцов, 1987).

Фотометрический метод (О.В. Бухарина с соавт., 1999). Бактериальную массу исследуемых культур стандартной бактериологической петлёй засеивали в 3 мл жидкой питательной среды и культивировали в термостате при температуре 37⁰С в течение 24 часов. На спектрофотометре СФ-46 (длина волны 540 нм) измеряли оптическую плотность (ОП) бульонной культуры против питательного бульона (У). Супернатант отделяли от бактериальных клеток центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин. Для определения АЛА в качестве тест-штамма использовали суточную агаровую культуру *Micrococcus luteus* АТТС 15307. Выросшие бактериальные клетки тест-штамма обрабатывали хлороформом в течение 60 минут, смывали, фильтровали через крупнопористый фильтр, дважды отмывали 1/15 М фосфатным буфером с трилоном Б и один раз 1/15 М фосфатным буфером (РН = 6,2), после чего оптическую плотность суспензии микрококка доводили до 0,300. На 1/15 М фосфатном буфере (РН = 6,2) готовили раствор лизоцима. Супернатант исследуемых культур микроорганизмов, объёмом 0,9 мл, смешивали с 0,1 мл приготовленного раствора лизоцима и инкубировали 60 – 120 минут при температуре 37⁰С. 0,5 мл смеси супернатанта и лизоцима добавляли к 2,0 мл суспензии тест-штамма микрококка и измеряли оптическую плотность полученной смеси через 30 и 150 с на спектрофотометре СФ-46 (длина волны 540 нм) против 1/15 М фосфатного буфера. В качестве контроля использовали смесь питательного бульона с лизоцимом в соотношении 9:1. По степени лизиса суспензии тест-культуры рассчитывали антилизоцимную активность исследуемой культуры по формуле:

$$A = \frac{V_1 C (1 - \Delta D_0 / \Delta D_k)}{V_2 Y},$$

где A – антилизотимная активность в микрограммах инактивированного лизотима/мл супернатанта; V_1 – объём (0,1 мл) раствора лизотима исходной концентрации (20 мкг/мл); V_2 – объём (0,9 мл) супернатанта бульонной культуры исследуемого штамма; C – исходная концентрация лизотима (20 мкг/мл); Y – оптическая плотность бульонной культуры исследуемого штамма, ед. оптической плотности; $\Delta D_0 - D_0$ – изменение оптической плотности суспензии тест-культуры в опыте между 30 и 150 с;

Определение антилизотимного признака микроорганизмов осуществляется при помощи чашечного и фотометрического методов.

Чашечный метод. Готовят ряд чашек Петри с питательным агаром, содержащим лизотим в различных концентрациях (от 0 до 10 мкг/мл). К 9 мл

расплавленного 1,5 %-го питательного агара добавляют 1 мл раствора лизотима в стерильном изотоническом (0,85 %) растворе хлорида натрия. Тщательно высушивают открытые перевернутые чашки Петри в течение 1 ч при температуре 37 °С. На поверхность приготовленных сред "пятачками" засевают исследуемые суточные агаровые культуры микроорганизмов. После инкубации в термостате при заданных режимах выросшие колонии убивают парами хлороформа. Для этого, держа чашки перевернутыми, вкладывают в их крышки кусочки бумаги ватман площадью 8-10 см², пропитанные 0,3-0,5 мл хлороформа. Чашки держат закрытыми 30-40 мин. Затем переворачивают чашки и сверху на колонии наслаивают 3-4 мл полужидкого (0,6-0,7 %) агара, смешанного с 0,1 мл взвеси агаровой индикаторной культуры *Micrococcus luteus* (lysodeikticus) ATCC 15307. Мутность взвеси соответствует 10 ед. оптического стандарта мутности (ГИСК им. Л. А. Тарасевича). Через сутки инкубации в термостате при температуре 37 °С проводят учет результата опыта по наличию роста микрококка на поверхности и вокруг колоний исследуемых культур, инактивировавших известную концентрацию лизотима, внесенного в питательную среду. На поверхности и вокруг неактивных культур рост микрококка отсутствует, так как оставшийся в среде лизотим лизирует индикаторный штамм.

За уровень антилизотимной активности исследуемых культур принимают максимальное значение концентрации лизотима в среде, при которой еще наблюдается рост микрококка. АЛА микроорганизмов выражают в микрограммах инактивированного лизотима.

$\Delta D_0 - D_k$ – изменение оптической плотности суспензии тест-культуры в контроле между

Работа

Задача. Рассчитать АЛА разных микроорганизмов. Используя значения оптической плотности приведенные в табл. 1, заполнить табл. 2 в тетради. Сравнить выраженность АЛА разных микроорганизмов. Сделать вывод.

Значение ОП

	1	30с	150с	2	30с	150с	3	30с	150с	4	30с	150с
	Candida			E.coli			S. aureus			Klebsiella		
A	K	0,392	0,275	K	0,415	0,305	K	0,373	0,28	K	0,369	0,278
B	1	0,392	0,371	1	0,404	0,388	1	0,376	0,351	1	0,3	0,231
C	2	0,409	0,393	2	0,403	0,389	2	0,372	0,36	2	0,281	0,21
D	3	0,429	0,427	3	0,337	0,288	3	0,292	0,179	3	0,291	0,231
E	4	0,414	0,398	4	0,411	0,397	4	0,385	0,369	4	0,292	0,224
F	5	0,4	0,387	5	0,348	0,292	5	0,327	0,231	5	0,265	0,18
G	6	0,418	0,412	6	0,416	0,403	6	0,317	0,218	6	0,273	0,19
H	K	0,373	0,258	K	0,410	0,300	K	0,38	0,26	K	0,405	0,300

Ячейки		Оптическая плотность		Δ Контроль	Δ Опыт	АЛА (мкг/мл)	АЛА $\pm\Delta$
		через 30 с	через 150 с				
Candida							
A	Контроль						
B	1						
C	2						
D	3						
E	4						
F	5						
G	6						
H	Контроль						

Контрольные вопросы: 1. Что такое антилизотимная активность? 2. В чем заключается суть чашечного метода определения АЛА? 3. В чем заключается суть фотометрического метода определения АЛА? 4. В каких единицах измеряется АЛА? 5. Какой микроорганизм является индикаторным при определении АЛА? 6. Как интерпретируются результаты чашечного метода определения АЛА?

Для определения **антикарнозиновой активности** необходимо:

1) Исследуемые культуры микроорганизмов выращиваются на мясопептонном агаре при 37°C в течение 24 часов.

2) Из выросших культур готовят одномолиардную взвесь, отбирают 0,1 мл, добавляют 1,7 мл мясопептонного бульона и 0,2 мл карнозина (разведение карнозина готовят таким образом, чтобы его конечная концентрация в МПБ с тест-штаммом составляла 1 мг/мл).

3) Параллельно с опытной готовят 3 контрольные пробы: а) контроль 1. К 0,2 мл карнозина в указанном выше разведении добавляют 0,1 мл физиологического раствора и 1,7 мл мясопептонного бульона, б) контроль 2. К 0,2 мл физиологического раствора добавляют 0,1 мл одномолиардной взвеси испытуемой культуры и 1,7 мл

мясопептонного бульона. в) контроль 3. К 0,3 мл физиологического раствора добавляют 1,7 мл мясопептонного бульона.

4) Опытную и контрольные пробы инкубируют в течение 24 часов при Т 37°C.

5) Во все пробы добавляют по 0,1 мл хлороформа и выдерживают в течение 40 минут.

6) Все пробы центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 минут.

7) Из опытной и контрольных проб отделяют супернатант (по 0,6 мл), добавляют к нему 1,1 мл мясопептонного бульона и 0,1 мл взвеси тест-культуры *M.luteus* (способ приготовления взвеси: 16-18-часовую агаровую культуру *M.luteus* смывают физиологическим раствором и готовят одномиллиардную взвесь по стандарту мутности. Полученную взвесь разводят физиологическим раствором в 10 раз и используют).

9) Все пробы инкубируют 24 часа при 37°C.

10) Замеряют оптическую плотность взвесей на фотоэлектроколориметре и рассчитывают антикарнозиновую активность исследуемой культуры по

формуле
$$C-C \cdot \left(\frac{OD_2 - OD_1}{OD_3 - OD_1} \right),$$

где С - исходная концентрация карнозина; OD - оптическая плотность взвеси в опыте;

OD₁ - оптическая плотность взвеси в контроле 1;

OD₂ - оптическая плотность взвеси в контроле 2;

OD₃ - оптическая плотность взвеси в контроле 3.

Антикарнозиновая активность выражается в мг/гЛ.

Работа

Задание: Рассчитать значение антикарнозиновой активности для следующих микроорганизмов: *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*.

Значение ОП

	1			2			3			4		
	<i>C. albicans</i>			<i>E.coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>K. pneumoniae</i>		
A	OD ₁	0,392	0,275	OD ₁	0,415	0,305	OD ₁	0,373	0,28	OD ₁	0,369	0,278
B	OD ₂	0,392	0,371	OD ₂	0,404	0,388	OD ₂	0,376	0,351	OD ₂	0,3	0,231
C	OD ₃	0,409	0,393	OD ₃	0,403	0,389	OD ₃	0,372	0,36	OD ₃	0,281	0,21
D	OD	0,429	0,427	OD	0,337	0,288	OD	0,292	0,179	OD	0,291	0,231
E	OD	0,414	0,398	OD	0,411	0,397	OD	0,385	0,369	OD	0,292	0,224
F	OD	0,4	0,387	OD	0,348	0,292	OD	0,327	0,231	OD	0,265	0,18
G	OD	0,418	0,412	OD	0,416	0,403	OD	0,317	0,218	OD	0,273	0,19
H	OD	0,373	0,258	OD	0,410	0,300	OD	0,38	0,26	OD	0,405	0,300

Контрольные вопросы: 1. Что такое антикарнозиновая активность? 2. В чем заключается суть метода определения АКрА? 3. В каких единицах измеряется АКрА? 5. Как рассчитывают АКрА?

Для определения **антилактоферриновой активности** микроорганизмов используют метод И.В. Вальшевой с соавт. (2005) на основе иммуноферментного анализа. Исследуемые культуры микроорганизмов выращивают на плотной питательной среде при 37⁰С в течение 18-24 ч, из выросшей агаровой культуры готовят взвесь микроорганизмов (10 ед. по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича) в жидкой питательной среде. Параллельно готовят раствор лактоферрина (200нг/мл) на забуференном физиологическом растворе. Взвесь исследуемых культур микроорганизмов объемом 150 мкл вносят в лунки стерильного полистиролового планшета и смешивают со 150 мкл приготовленного раствора лактоферрина. Параллельно с опытной готовят контрольную пробу: в лунки планшета вносят 150 мкл раствора лактоферрина и 150 мкл жидкой питательной среды. Пробы инкубируют при 37⁰С в течение 24ч. После инкубации содержимое лунок переносят в пластиковые пробирки, центрифугируют при 3000-8000 об/мин в течение 20 минут на холоде, отбирают 50 мкл супернатанта в опытной и контрольной пробирках.

Пробы разводят в 5 раз (до объема 250 мкл) рабочим раствором фосфатно-солевого буфера с твином. Для достоверности получаемых результатов опыт и контроль проводят в трех дублях.

Концентрацию лактоферрина в пробах определяют с использованием реагентов ЗАО Вектор-Бест (рис.1.). В лунки первого ряда планшета с иммобилизованными антителами к лактоферрину вносят по 100 мкл раствора калибровочных образцов. В остальные лунки вносят по 100 мкл анализируемых образцов. Планшет выдерживают в течение 30 мин при 37⁰С, после чего содержимое лунок удаляют энергичным встряхиванием в кювету с дезинфицирующим раствором.

Лунки промывают 3 раза рабочим буферным раствором и дважды дистиллированной водой. Далее во все лунки добавляют по 100 мкл раствора конъюгата антител с пероксидазой хрена и выдерживают в течение 30 мин при температуре 37⁰С, после чего содержимое лунок удаляют встряхиванием, лунки промывают 3 раза рабочим буферным раствором и дважды дистиллированной водой. Затем в лунки добавляют по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Стрипы выдерживают в течение 10-20 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. По истечении указанного времени во все стрипы добавляют 100 мкл стоп-реагента.

Регистрацию результатов в лунках с опытной и контрольной пробами проводят на фотометре ИФА-ОЭП при длине волны 450 нм. По результатам измерения строят график в координатах: ось абсцисс - концентрация лактоферрина в калибровочных образцах (нг/мл), ось ординат- соответствующее значение оптической плотности. Концентрацию лактоферрина в опытных и контрольных пробах определяют по калибровочному графику.

Найденные по графику значения концентрации лактоферрина умножают на коэффициент разведения проб, выражают результат в нг/мл.

АЛФА рассчитывают по формуле:

$$C = (C_k - O_o) \times 4$$

C - антилактоферриновая активность микроорганизмов - нг инактивированного лактоферрина/ мл супернатанта;

C_к – концентрация лактоферрина в контроле, нг/мл;

O_о – концентрация лактоферрина в опыте, нг/мл;

4-коэффициент разведения.

Работа

Задача. Рассчитать АЛФА разных микроорганизмов. Используя значения оптической плотности приведенные в табл. 1, заполнить табл. 2 в тетради. Сравнить выраженность АЛФА разных микроорганизмов. Сделать вывод.

Значение ОП

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,376	0,212	0,179	0,194	0,082	0,073	0,083	0,083	0,11	0,094	0,238	0,218
B	0,151	0,688	0,874	0,926	0,081	0,08	0,08	0,08	0,337	0,345	0,217	0,226
C	0,521	0,268	0,27	0,271	0,114	0,108	0,112	0,112	0,492	0,711	0,151	0,18
D	0,758	4,444	4,438	4,467	0,189	0,202	0,19	0,19	0,842	1,163	0,177	0,102
E	1,469	0,471	0,421	0,333	0,075	0,071	0,072	0,072	1,177	2,125	0,26	0,244
F	2,289	1,588	1,957	2,862	0,082	0,075	0,078	0,078	0,516	0,643	0,095	0,097
G	3,21	0,189	0,161	1,048	0,074	0,078	0,079	0,079	0,101	0,084	0,096	0,092
H	1,595	0,532	0,32	0,291	0,079	0,074	0,074	0,074	0,13	0,081	0,116	0,117
	K	Candida			E.coli			S. aureus			Klebsiella	

№ штамма	Ячейки	Оптическая плотность			АлфА	АлфА±Δ
		1	2	3		
Candida						
1	A					
2	B					
3	C					
4	D					
5	E					
6	F					
7	G					
8	H					

Контрольные вопросы: 1. Что такое антилактоферриновая активность? 2. В чем заключается суть фотометрического метода определения АЛФА? 3. В чем заключается суть работы набора реагентов для определения концентрации лактоферрина? 4. В каких единицах измеряется АЛФА? 5. Как рассчитывают АЛФА?

Для обнаружения **антикомплементарной активности** необходимо произвести:

1 день Посев культур на плотную питательную среду

2 день Суточную бульонную культуру засеваем в 3 мл МПБ. Инкубируем взвесь 18-24 часа при 37 °С.

3 день

1. Замеряем оптическую плотность против бульона (СФ 492)

2. Центрифугируем пробы 3000 об/мин – 15 минут

3. Супернатанты храним при 4°С, либо замораживаем. Контроль: 3 мл МПБ

4. 100 мкл супернатанта + 100 мкл комплемента

Инкубируем в планшете 30 мин при 37 °С.

5. 100 мкл из смеси (пункт 4) переносим в 2,7 мл VBS (охлажденного)

6. Замеряем скорость лизиса эритроцитов на спектрофотометре при 800 нм и красном фильтре
(фиксируем максимальное значение, 4-5 минут)

Замер скорости лизиса эритроцитов

Все делаем при 37 °С. На каждые пять проб - 1 контроль. Первый замер – контроль.

Пробу в течение трех минут нагреваем на водяной бане. К опытной или контрольной пробе (2,8 мл) + 200 мкл сенсibilизированных эритроцитов перемешиваем, помещаем в кювету, замер осуществляется против VBS- контроль.

АКА определяем по формуле:

$$\text{АКА} = \frac{\text{ОД}_k - \text{ОД}_{\text{оп}}}{\text{ОД культуры}} * 60 = X * 10^6 \text{ Анти/лек с.}$$

где ОД_k – оптическая плотность в контроле;

$\text{ОД}_{\text{оп}}$ – оптическая плотность в опыте;

ОД культуры – оптическая плотность взвеси микроорганизмов.

Работа

Задание: Рассчитать значение антикомплементарной активности для следующих микроорганизмов: *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*.

Значение ОП

	1			2			3			4		
	C. albicans			E.coli			S. aureus			K. pneumoniae		
A	ОД _к	0,39	0,27	ОД _к	0,41	0,30	ОД _к	0,37	0,28	ОД _к	0,36	0,27
B	ОД _к	0,39	0,37	ОД _к	0,40	0,38	ОД _к	0,37	0,35	ОД _к	0,3	0,23
C	ОД _{оп}	0,40	0,39	ОД _{оп}	0,40	0,38	ОД _о _п	0,37	0,36	ОД _о _п	0,28	0,21
D	ОД _{оп}	0,42	0,42	ОД _{оп}	0,33	0,28	ОД _о _п	0,29	0,17	ОД _о _п	0,29	0,23
E	ОД _{оп}	0,41	0,39	ОД _{оп}	0,41	0,39	ОД _о _п	0,38	0,36	ОД _о _п	0,29	0,22
F	ОД _{оп}	0,4	0,38	ОД _{оп}	0,34	0,29	ОД _о _п	0,32	0,23	ОД _о _п	0,26	0,18
G	ОД _{оп}	0,41	0,41	ОД _{оп}	0,41	0,40	ОД _о _п	0,31	0,21	ОД _о _п	0,27	0,19
H	ОД _{оп}	0,37	0,25	ОД _{оп}	0,41	0,30	ОД _о _п	0,38	0,26	ОД _о _п	0,40	0,30

Контрольные вопросы: 1. Что такое антикомплементарная активность? 2. В чем заключается суть метода определения антикомплементарной активности? 3. В каких единицах измеряется антикомплементарная активность? 5. Как рассчитывают АКА?

IgA-протеазную активность микроорганизмов необходимо определять по методике О.В. Бухарина с соавт. (2004).

В лунки стерильного полистиролового планшета вносили по 20 мкл 1 млрд. взвеси тест-культур микроорганизмов и раствора иммуноглобулина («Иммуноглобулин человека нормальный», Микроген, Россия) в соответствии с требованиями инструкции по работе с реагентами ИФА.

В контрольную пробу, вместо микробной взвеси вносили 20 мкл забуференного физиологического раствора. Через 24 часа инкубации при 37 °С пробы переносили в пластиковые пробирки типа «эппендорф» и центрифугировали 20 минут при 8 тыс. оборотов в минуту, при +5 °С.

Остаточную концентрацию иммуноглобулинов в опытной и контрольной пробах определяли иммуноферментным анализом с использованием набора «IgA общий-ИФА-БЕСТ» (Вектор-БЕСТ, Россия) в соответствии с инструкцией использования данных реагентов.

Измерение оптической плотности опытной и контрольной проб проводили на фотометре STAT FAX 2100 (США) при 492 нм. IgA-протеазную активность рассчитывали по формуле (3):

$$AI_{IgA} = \frac{C_k - C_o}{C_k} \times 100\%, \quad (3)$$

где C_k – концентрация иммуноглобулина в контроле, мкг/мл;

C_o – концентрация иммуноглобулина в опыте, мкг/мл.

Работа

Задание: Рассчитать значение IgA-протеазной активности для следующих микроорганизмов: *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*.

Значение ОП

	1			2			3			4		
	C. albicans			E.coli			S. aureus			K. pneumoniae		
A	Ск	0,39	0,27	Ск	0,41	0,30	Ск	0,37	0,28	Ск	0,36	0,27
B	Со	0,39	0,37	Со	0,40	0,38	Со	0,37	0,35	Со	0,3	0,23
C	Со	0,40	0,39	Со	0,40	0,38	Со	0,37	0,36	Со	0,28	0,21
D	Со	0,42	0,42	Со	0,33	0,28	Со	0,29	0,17	Со	0,29	0,23
E	Со	0,41	0,39	Со	0,41	0,39	Со	0,38	0,36	Со	0,29	0,22
F	Со	0,4	0,38	Со	0,34	0,29	Со	0,32	0,23	Со	0,26	0,18
G	Со	0,41	0,41	Со	0,41	0,40	Со	0,31	0,21	Со	0,27	0,19
H	Со	0,37	0,25	Со	0,41	0,30	Со	0,38	0,26	Со	0,40	0,30

Контрольные вопросы: 1. Что такое IgA-протеазная активность? 2. В чем заключается суть метода определения IgA-протеазной активности? 3. В каких единицах измеряется IgA-протеазная активность? 5. Как рассчитывают IgA-протеазную активность?

2.9 Лабораторная работа №9 (2 часа).

Тема: «Методы количественного определения факторов вирулентности микроорганизмов».

2.9.1 Цель работы: Изучить факторы вирулентности патогенных микроорганизмов

2.9.2 Задачи работы:

1. Освоить способы количественного определения факторов вирулентности микроорганизмов

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры микроорганизмов, пробирки, физиологический раствор, чашки петри, бактериологические петли, спиртовки, термостат, лабораторные животные.

2.9.4 Описание (ход) работы:

Для характеристики вирулентности пользуются количественными показателями, определяющими способность исследуемой микробной культуры вызывать гибель искусственно зараженных ею подопытных животных. Изучение вирулентности бывает сопряжено с рядом трудностей, так как она определяется не только комплексом культурно-морфологических, токсигенных и биологических свойств микроба, но и резистентностью микроорганизма, подверженной большим колебаниям в связи с видом, возрастом животных, режимом их питания, температурой внешней среды, а также способом заражения, принятым в опыте. Поэтому при установлении вирулентности микроба очень важно вести исследование, точно соблюдая стандартность всех условий опыта.

Для определения вирулентности микробных культур чаще всего используют белых мышей. В том случае, когда белые мыши невосприимчивы к исследуемому возбудителю заболевания, пользуются другими видами животных: крысами, морскими свинками или кроликами.

Для определения вирулентности применяют молодую культуру микроба, так как старые культуры содержат большое количество мертвых клеток.

Культуру микроба для заражения выращивают на мясо-пептонном агаре или другой плотной питательной среде, так как бульон, представляя собой сложный белковый субстрат, небезразличен для животного организма и может извращать результаты опыта. Исследуемую культуру микроба, выращенную на скошенном мясо-пептонном агаре, смывают изотоническим раствором хлорида натрия и стандартизуют по оптическому стандарту так, чтобы в 1 мл этого раствора содержалось определенное количество микробных тел. В зависимости от вида культуры, патогенности ее для животных, взятых в опыт, а также от цели и задач исследования количество микробных тел, содержащееся в 1 мл взвеси, может колебаться от единиц до миллиардов. В тех случаях, когда по каким-либо причинам получить агаровую культуру невозможно, пользуются суточной бульонной культурой. Для определения минимальной летальной дозы из бульонной культуры готовят ряд последовательных десятикратных разведений: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 и т.д.

Исследуемую взвесь бактерий вводят различными способами: внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно, интраназально—в зависимости от целей и задач исследования.

Отстандартизованную взвесь микробов в изотоническом растворе хлорида натрия, а также разведения бульонной культуры готовят с таким расчетом, чтобы различные дозы микроба, используемые в опыте, содержались в одинаковых объемах жидкости.

Каждую дозу культуры вводят одновременно нескольким животным. При определении минимальной смертельной дозы учитывают и отмечают в протоколе опыта следующие данные:

- количество микробов, введенных в организм животного;
- способ их введения;
- масса тела зараженного животного;
- сроки гибели после заражения.

Степень вирулентности чаще всего характеризуют тремя следующими показателями:

- Минимальная смертельная доза Dlm (*Dosis letalis minima*), т.е. наименьшая доза микробов, которая при определенном способе заражения, в определенных условиях опыта вызывает гибель около 95% подопытных животных.
- Наименьшая безусловно смертельная доза Dll (*Dosis letalis*) — наименьшая доза микробов, являющаяся смертельной для всех 100% животных, взятых в опыт.
- Средняя смертельная доза микробов LD50 (*Dosis letalis 50%*)—доза микробов, вызывающая гибель 50% зараженных животных.
- Показатель LD50 позволяет получить более достоверные результаты, и потому он чаще других используется в практике экспериментальных исследований.

В отличие от Dlm и Dll, определявшихся непосредственно по результатам опыта, LD50 вычисляется путем довольно сложных математических расчетов. Более прост метод Кербера, в котором простота расчета удачно сочетается с достаточно высокой точностью получаемых результатов.

Аттенуация— искусственное стойкое ослабление вирулентности патогенных микроорганизмов, сохраняющих способность вызывать иммунитет. Аттенуация используется при изготовлении живых вакцин против туберкулеза, оспы. Термин произошел от латинского слова *attenuatio* — уменьшение.

Контрольные вопросы: 1. Характеристика основных факторов вирулентности условно-патогенных микроорганизмов. 2. Способ количественного определения факторов вирулентности микроорганизмов.