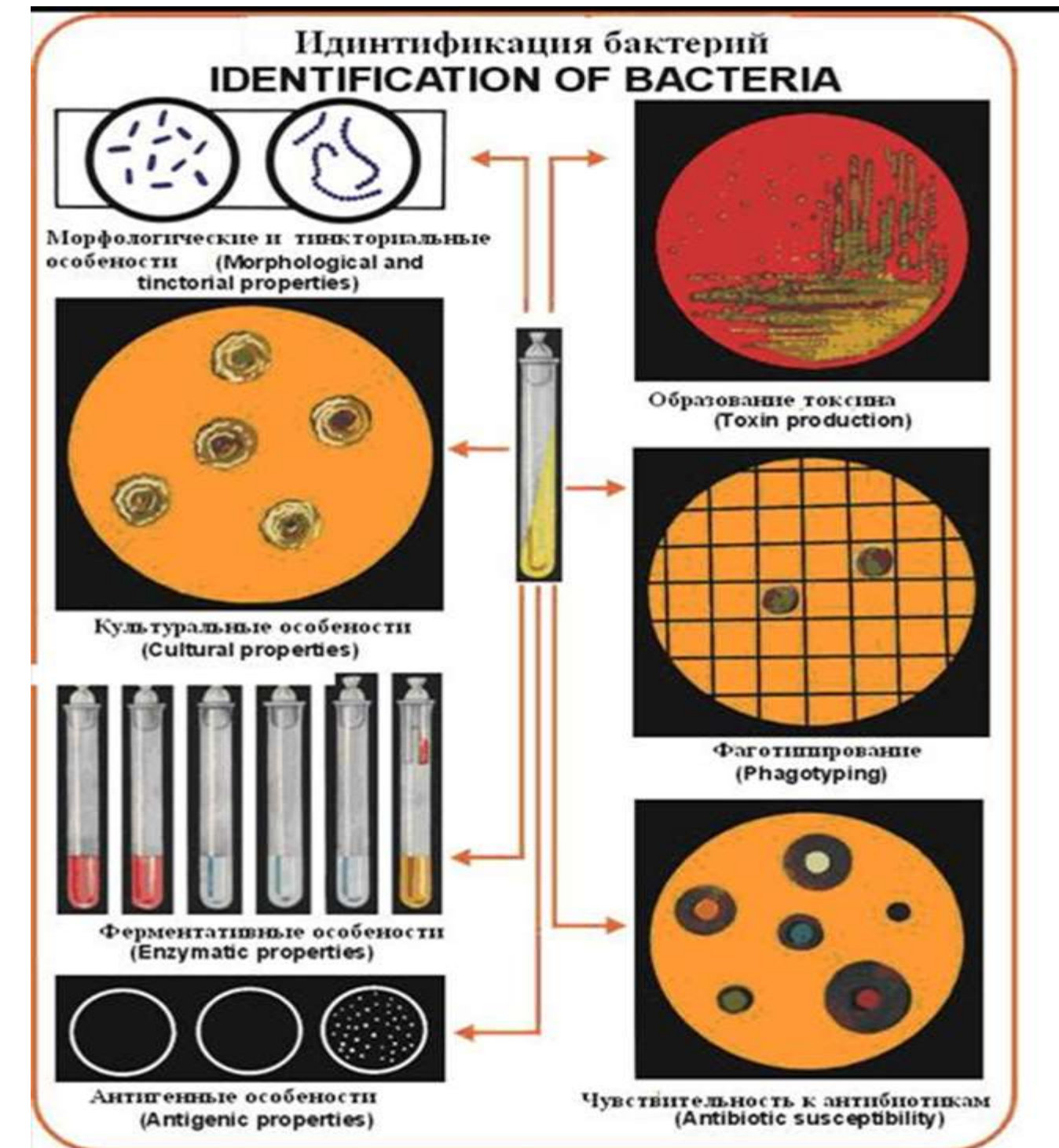


Молекулярно-биологические, физико-химические методы диагностики инфекционных заболеваний

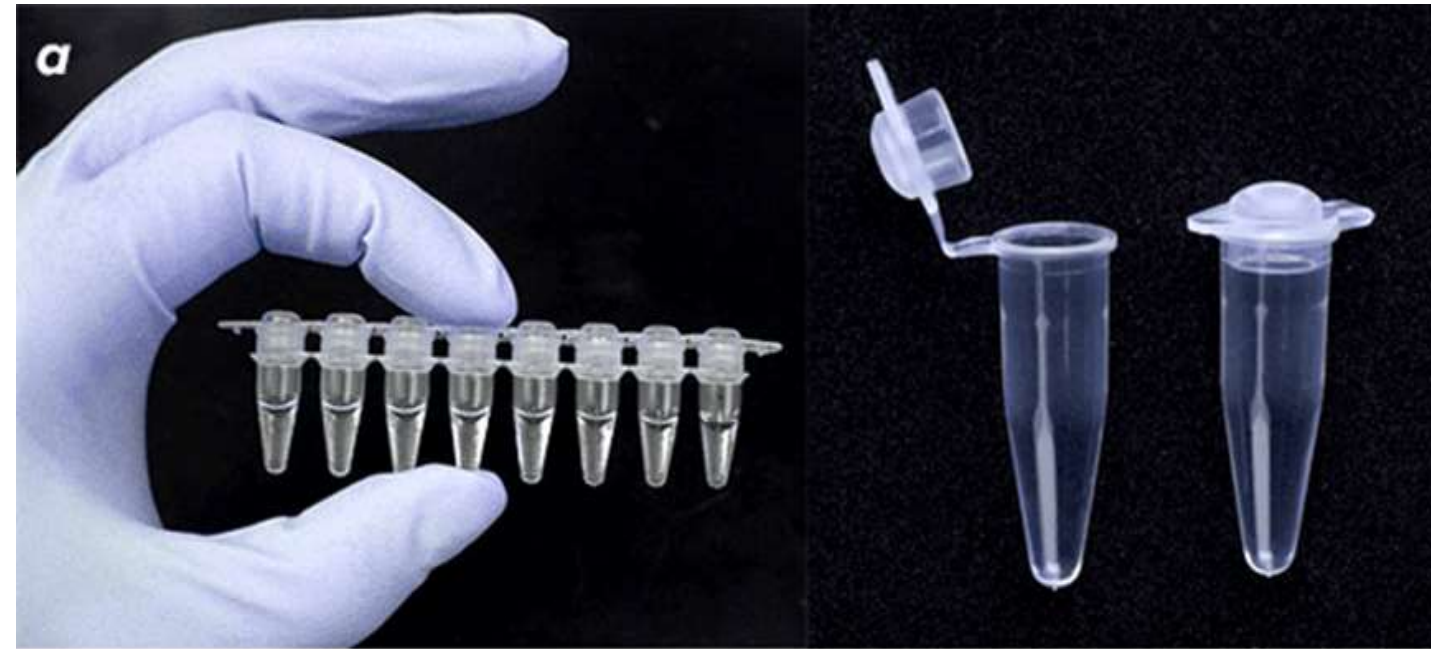
**Баязитова Лира Табрисовна, к.м.н.,
доцент кафедры микробиологии
имени академика В.М. Аристовского Казанского ГМУ
Минздрава России**

- Заболевания, вызванные патогенными и условно–патогенными микроорганизмами, составляют значительную часть в структуре заболеваемости и смертности во многих странах мира.
- Для организации эффективных лечебно–профилактических мероприятий необходима быстрая и качественная микробиологическая диагностика, важнейшим этапом которой является идентификация возбудителя инфекционного процесса

- Классические способы микробиологической диагностики, основанные на культивировании микробов на питательных средах, не всегда отвечают современным требованиям, предъявляемым к качеству медицинской помощи.
- Культуральные способы микробиологической диагностики достаточно информативны, но обладают серьезным недостатком – длительностью выполнения и выдачи заключения, которая может приводить к несвоевременной постановке диагноза и задержке назначения антимикробного лечения.



Полимеразно-цепная реакция

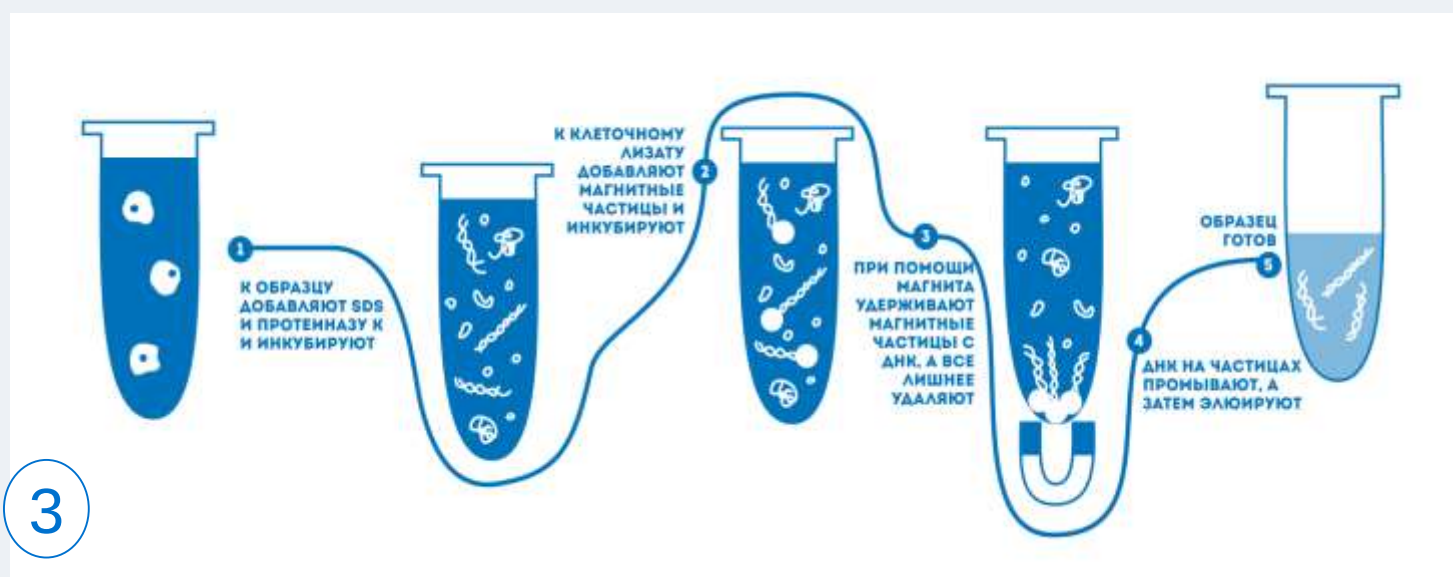
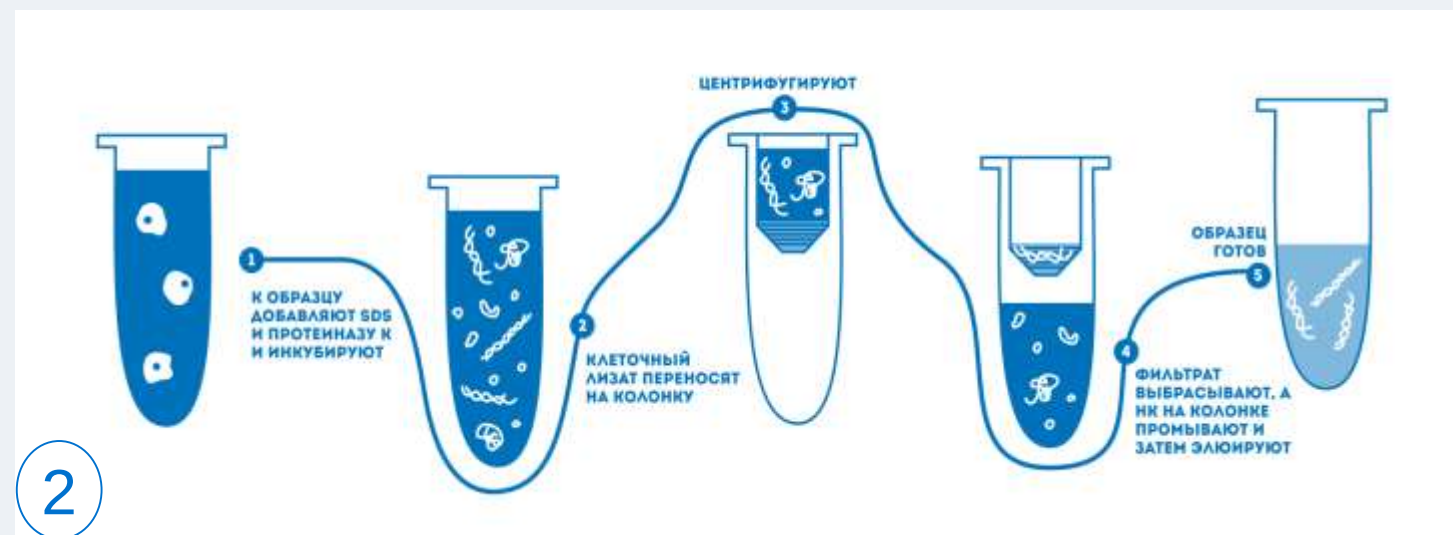
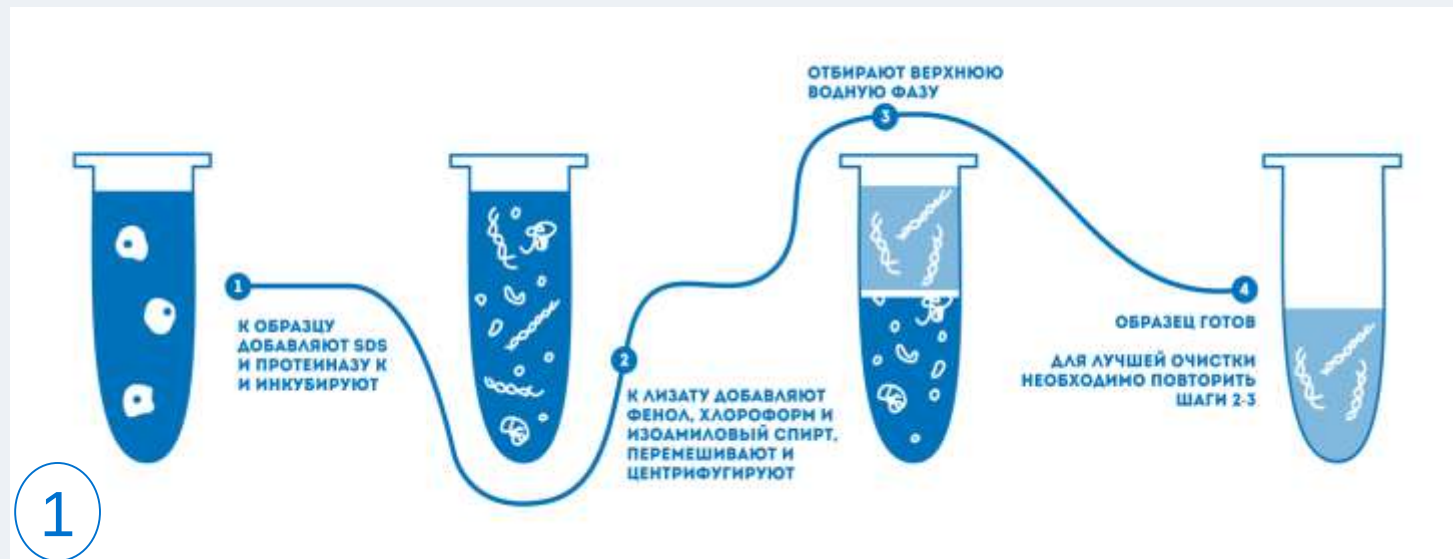


б



а — ПЦР-пробирки. б — Амплификатор

Первый этап генетического исследования. Методы выделения нуклеиновых кислот.



Две группы:

➤ Жидкофазные

1. Экстракция фенол-хлороформом

➤ Твердофазные

2. Выделение на спин-колонках

3. Выделение на магнитных частицах и др.

Методы выделения нуклеиновых кислот - две группы: жидкие и твердофазные – в зависимости от того, в какой среде оказывается итоговый продукт.

Экстракция фенол-хлороформ: после центрифугирования лизированных клеток белки и липиды остаются в нижней органической фазе, а нуклеиновые кислоты – в верхней водной.

Метод выделения – использование микроколонок. Нуклеиновые кислоты связываются с силикатами, расположенными на мембране колонки, после чего промываются и элюируются. Один из эффективных методов – это выделение при помощи магнитных частиц. Нуклеиновые кислоты с веществом на поверхности частиц, затем промываются и отделяются с помощью магнита.

Автоматизированный процесс выделения ДНК в лаборатории



Система для автоматического выделения и очистки нуклеиновых кислот



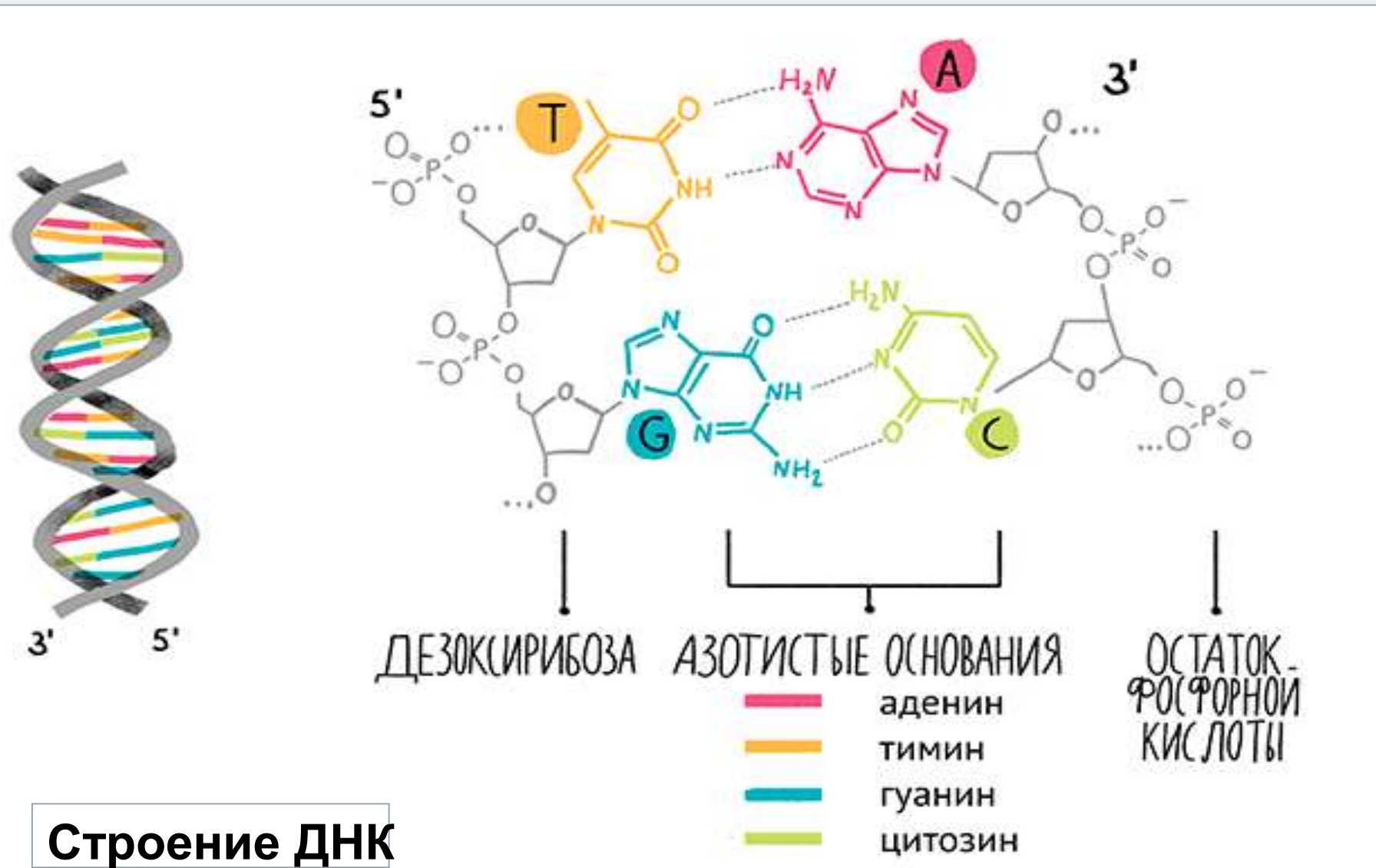
Преимущества:

- Автоматизация
- Производительность
- Сокращение времени анализа
- Универсальность (выделение ДНК, РНК и белков на одном приборе)
- Стандартизация, качество
- Минимальный риск кросс-контаминации



Принцип метода ПЦР

<https://www.dna-technology.ru>



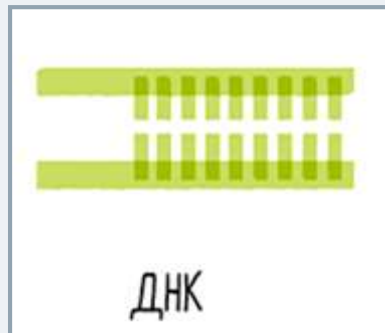
Строение ДНК

- Две цепи нуклеотидов **расположены** в молекуле ДНК **антипараллельно**, то есть напротив 3'-конца одной находится 5'-конец другой.
- Водородные связи обеспечивают стабильность молекулы по принципу **комплементарности**: Аденин соединяется только с Тимином, а Гуанин — с Цитозином.
- Поэтому, имея одну цепь ДНК, в соответствии с этим правилом легко построить ее пару

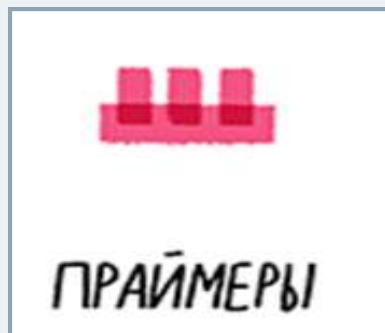
Метод ПЦР заключается в получении множества копий ДНК. Строение ДНК: двухцепочечная молекула состоит из звеньев-нуклеотидов. Нуклеотиды соединяются в цепочку, образуя связи между фосфатной группой одного нуклеотида и гидроксильной— другого. В результате на одном конце каждой цепи ДНК «висит» фосфатная группа (5'-конец), а на другом— гидроксильная (3'-конец). Две цепи нуклеотидов расположены в молекуле ДНК антипараллельно, то есть напротив 3'-конца одной находится 5'-конец другой. Водородные связи обеспечивают стабильность молекулы по принципу комплементарности: Аденин соединяется только с Тимином, а Гуанин — с Цитозином. И поэтому, имея одну цепь ДНК, в соответствии с этим правилом можно построить ее пару.



Состав реакционной смеси для проведения ПЦР



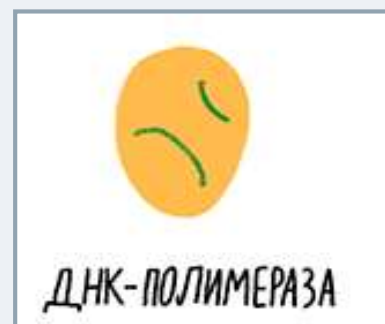
Может быть, как отдельный кусочек молекулы, так и плазмида, хромосома или геном клетки полностью.



Искусственно синтезированная короткая цепочка нуклеотидов, комплементарная выбранному участку одной из цепей анализируемой ДНК. Один из праймеров обычно соответствует началу амплифицируемого отрезка, другой — его концу, но на противоположной цепи.



Аденин, тимин, гуанин, цитозин — четыре вида «кирпичиков» для строительства цепей ДНК.



Фермент, строящий комплементарную матричную цепь ДНК. Он может начинать синтез только от 3'-конца праймера



Раствор-буфер, содержащий различные ионы для поддержания нужного pH, неионный детергент, соли.

Все компоненты смешивают в нужном объеме деионизованной воды в специальных пробирках для ПЦР и помещают в амплификатор

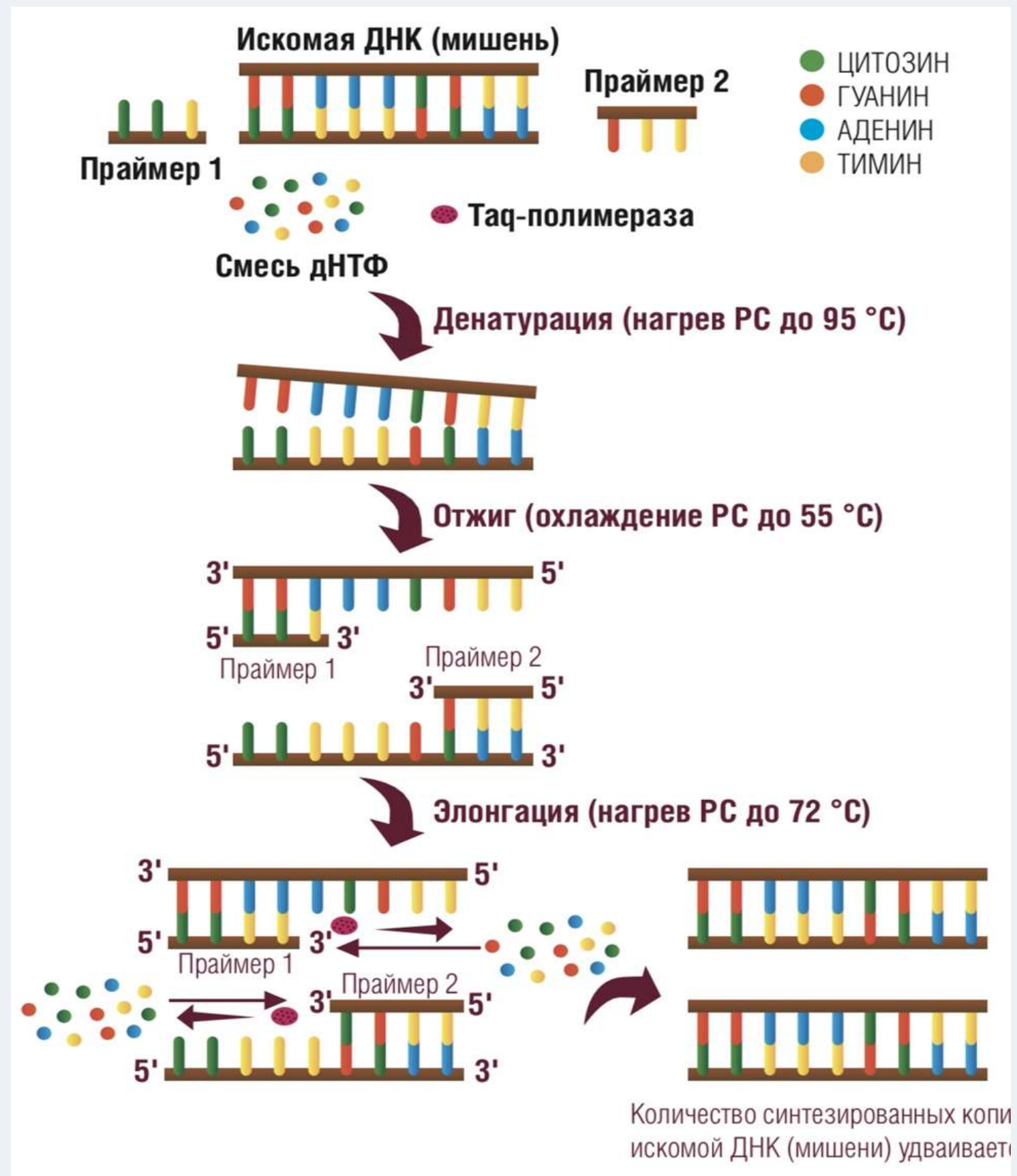


б



а — ПЦР-пробирки. б — Амплификатор

Проведение ПЦР на матрице ДНК. Этапы реакции.



1 Денатурация

2 Отжиг праймеров

3 Элонгация

- Цель ПЦР — получить множество одинаковых кусочков ДНК строго определенной длины.
- Проводят 20–30 циклов реакции.
- Каждый цикл состоит из трех этапов

Детекция (визуализация) результатов ПЦР.

1

Электрофоретический (в агарозном или полиакриламидном геле)

2

Гибридизационно-ферментный

3

Гибридизационно-флуоресцентный:

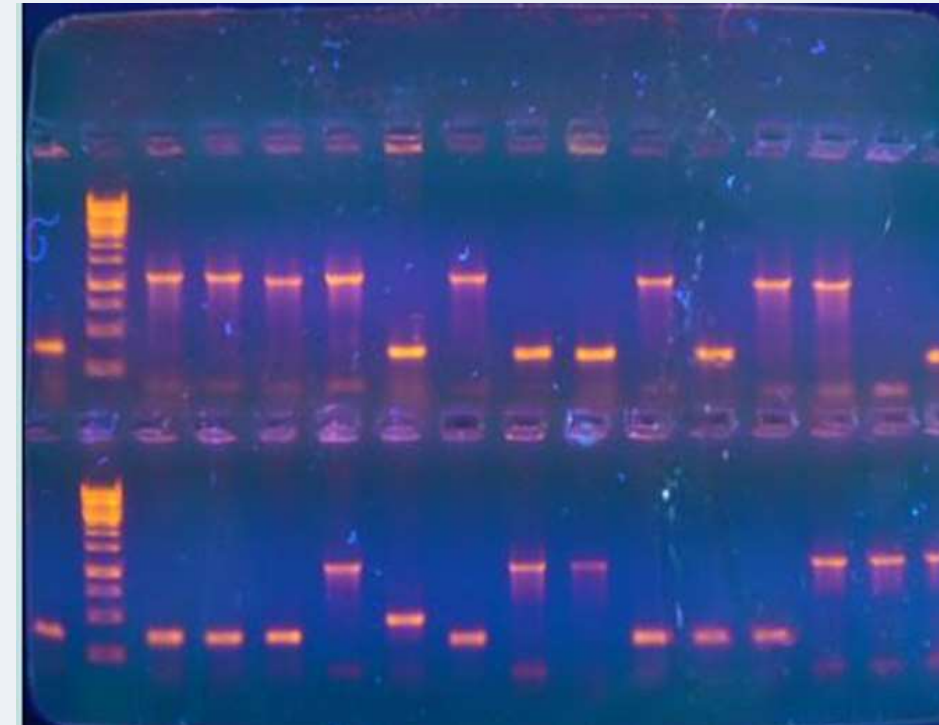
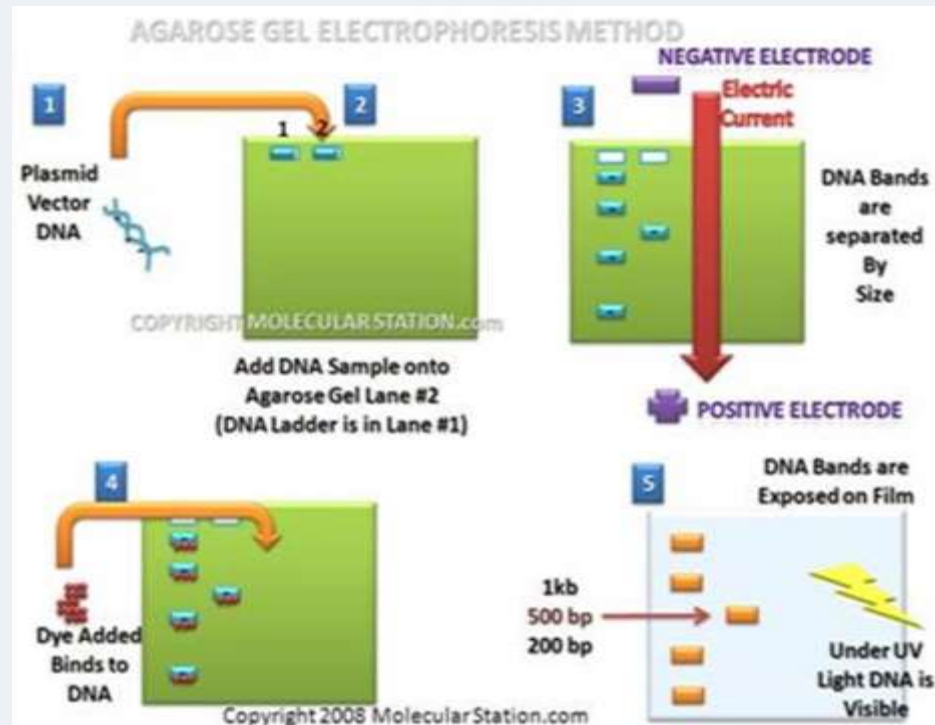
А

регистрация продукта после окончания реакции амплификации – «анализ по конечной точке»

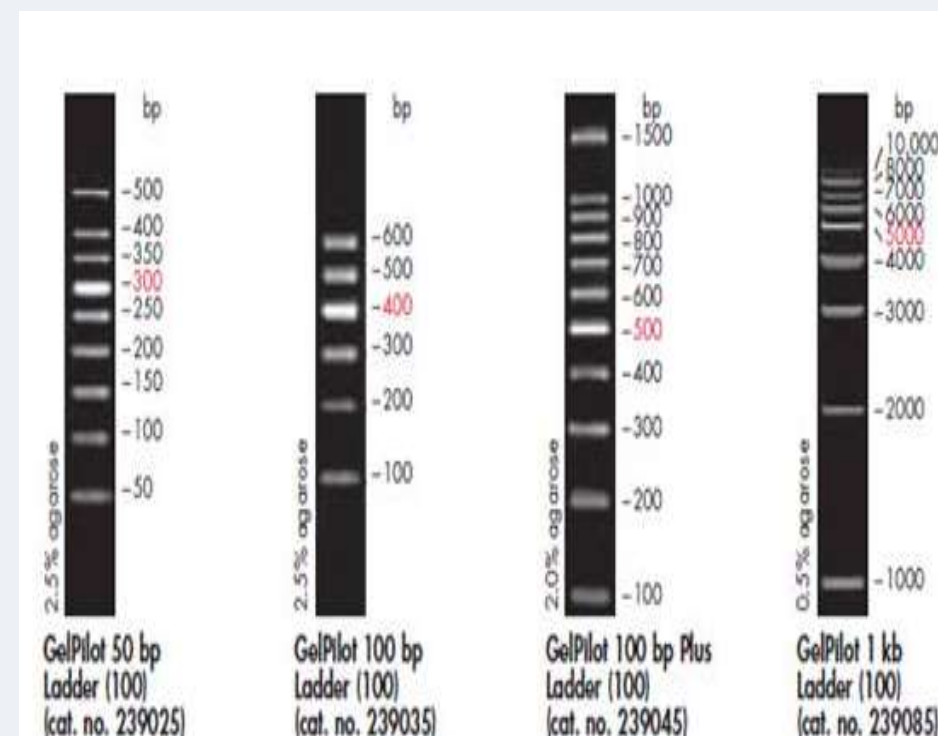
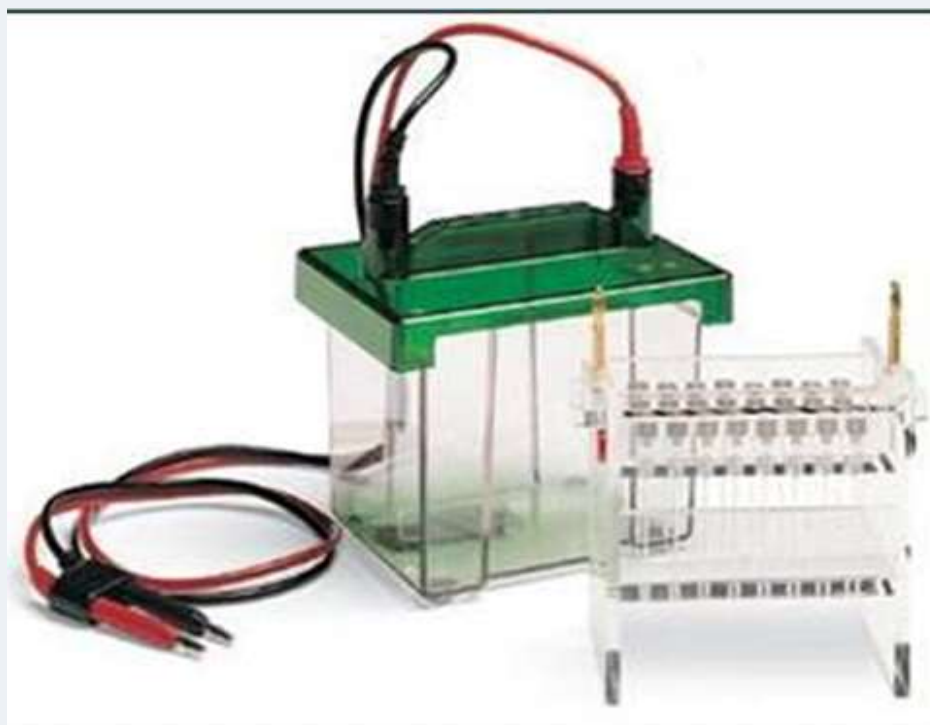
В

детекция продукта в режиме реального времени

Метод гель – электрофореза



- Ход исследования:
- Визуализацию результатов проводят в пластине агарозного геля.
 - Пластину геля помещают в аппарат для горизонтального гель-электрофореза и подключают источник постоянного напряжения.
 - Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от минуса к плюсу. При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные.
 - Пробы, в которых положение полученной полосы точно совпадают с положением контроля, считаются положительными



Недостатки:

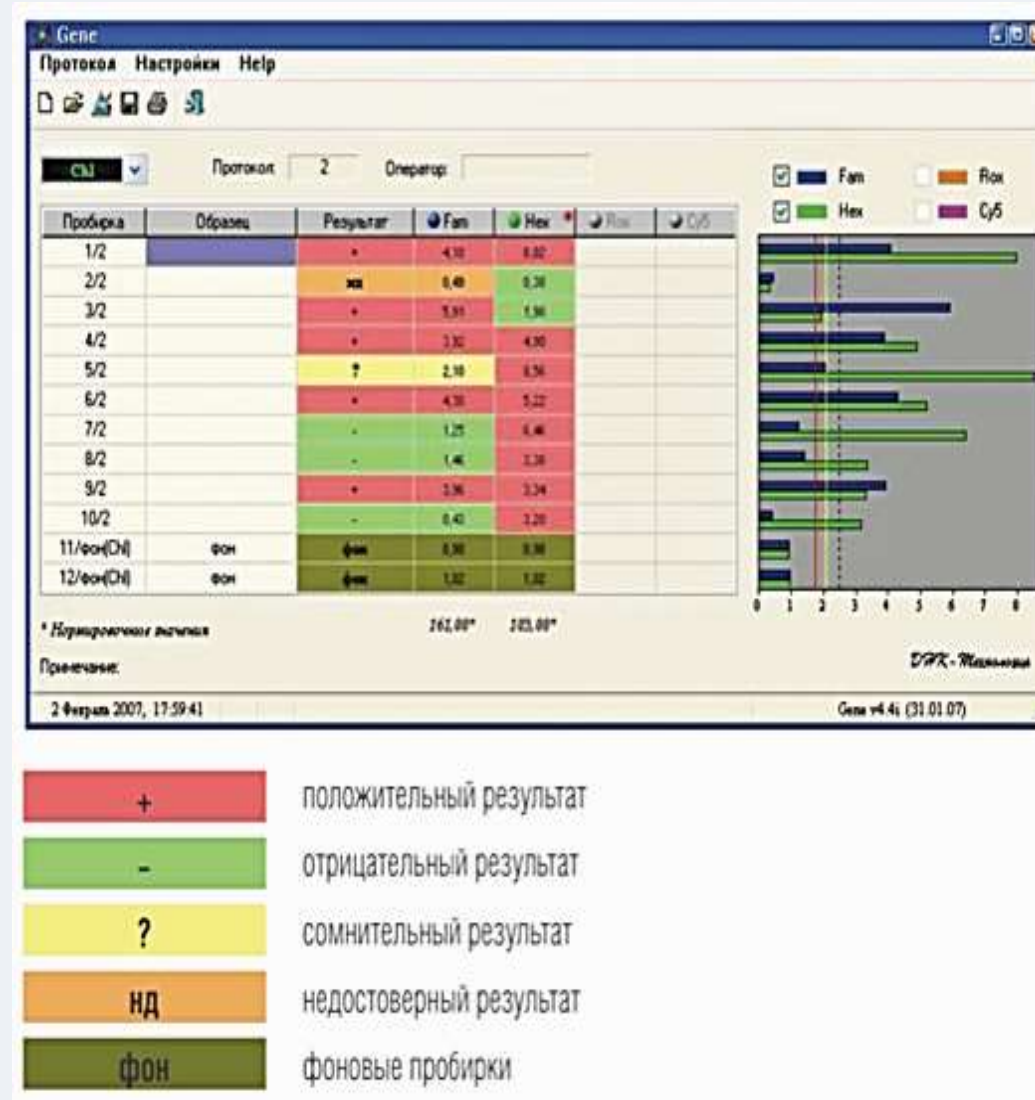
- Большие затраты времени.
- Невозможность автоматизации.
- Высокий риск контаминации.



ПЦР с анализом результатов по конечной точке



Детектор флуоресценции



Результаты исследования в формате ПЦР FLASH

Качественный анализ

Учет результатов –

- наличие флуоресценции после амплификации.

Недостатки:

- сокращение диагностических возможностей лаборатории (определение вирусной нагрузки, анализ биоценозов)

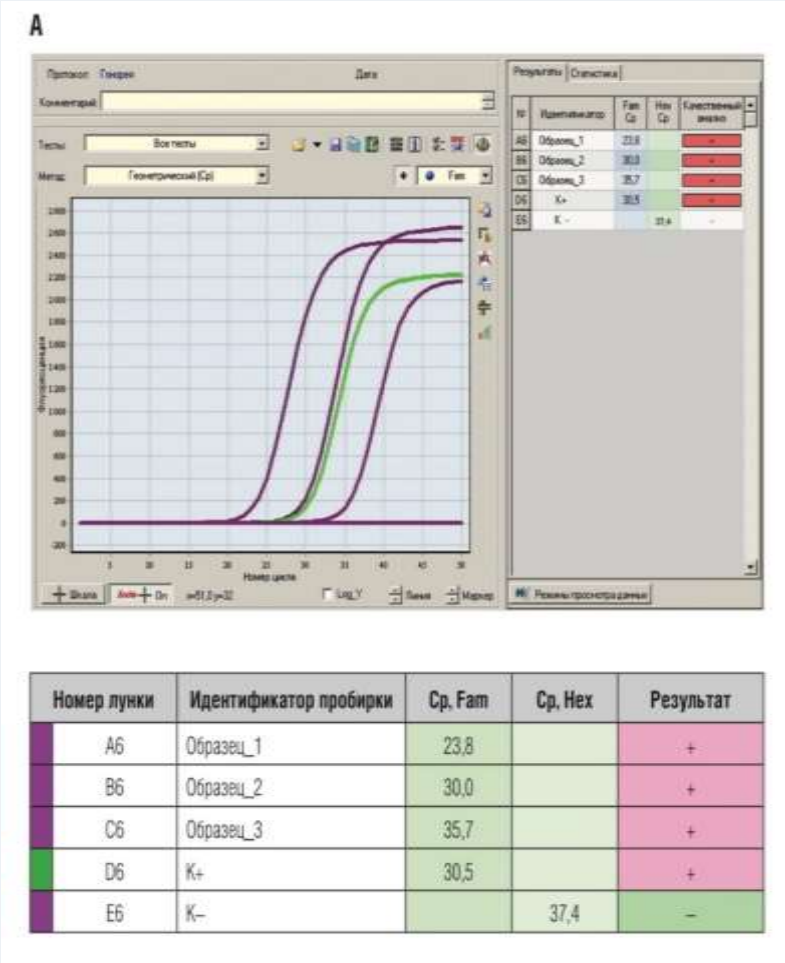


ПЦР с анализом результатов по конечной точке (End-point PCR) – это модификация метода ПЦР, которая позволяет учитывать результаты реакции по наличию флуоресценции после амплификации. Для проведения амплификации анализа результатов ПЦР FLASH используют специальное оборудование: термоциклеры и детекторы флуоресценции. Метод позволяет проводить только качественный анализ.

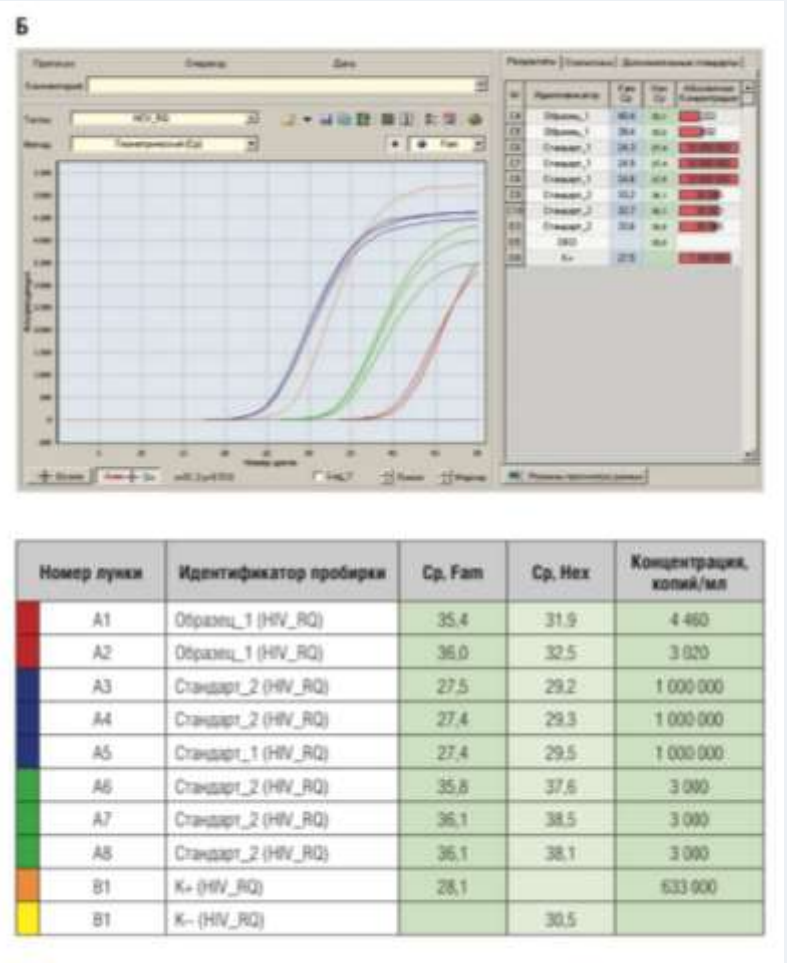
ПЦР в режиме реального времени (Real-Time PCR, ПЦР-РВ)



Амплификатор для ПЦР-анализа (real-time)



Результаты исследований в формате ПЦР-РВ
А – качественный анализ Б – количественный анализ



Количественный анализ

Детектируемый флуоресцентный сигнал состоит из трех последовательных участков:

- 1 – базовая линия (сигнал не превышает предела детектирования прибора);
- 2 – экспоненциальная амплификация;
- 3 – плато.

Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастает пропорционально количеству продукта амплификации.

ПЦР –РВ используется для одновременной амплификации, детекции и измерения количества искомой мишени. Преимущество -возможность количественного определения специфической последовательности НК в образце после каждого цикла амплификации. Детектируемый флуоресцентный сигнал может состоять из трех последовательных участков: 1 – базовая линия (сигнал не превышает предела детектирования прибора); 2 – экспоненциальная амплификация; 3 – плато. Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастает пропорционально кол-ву продукта амплификации

Комплексная автоматизация ПЦР-лаборатории

Вариант автоматизации ПЦР-исследований

ПК и ПО



Получение заявок из ЛИС, регистрация и маркировка биоматериала, формирование протокола выделения нуклеиновых кислот

Станции выделения НК и белков



Выделение нуклеиновых кислот

ПК и ПО



Формирование протокола амплификации и задания на дозирование реагентов и выделенных нуклеиновых кислот



Станция дозирования



Дозирование проб и реагентов в микропланшет

ПК и ПО



Получение результатов и передача в ЛИС

Амплификатор



Запечатывание подготовленного микропланшета, в перспективе — автоматический поиск протокола амплификации по уникальному штрих-коду микропланшета

Масс-спектрометрический метод исследования:



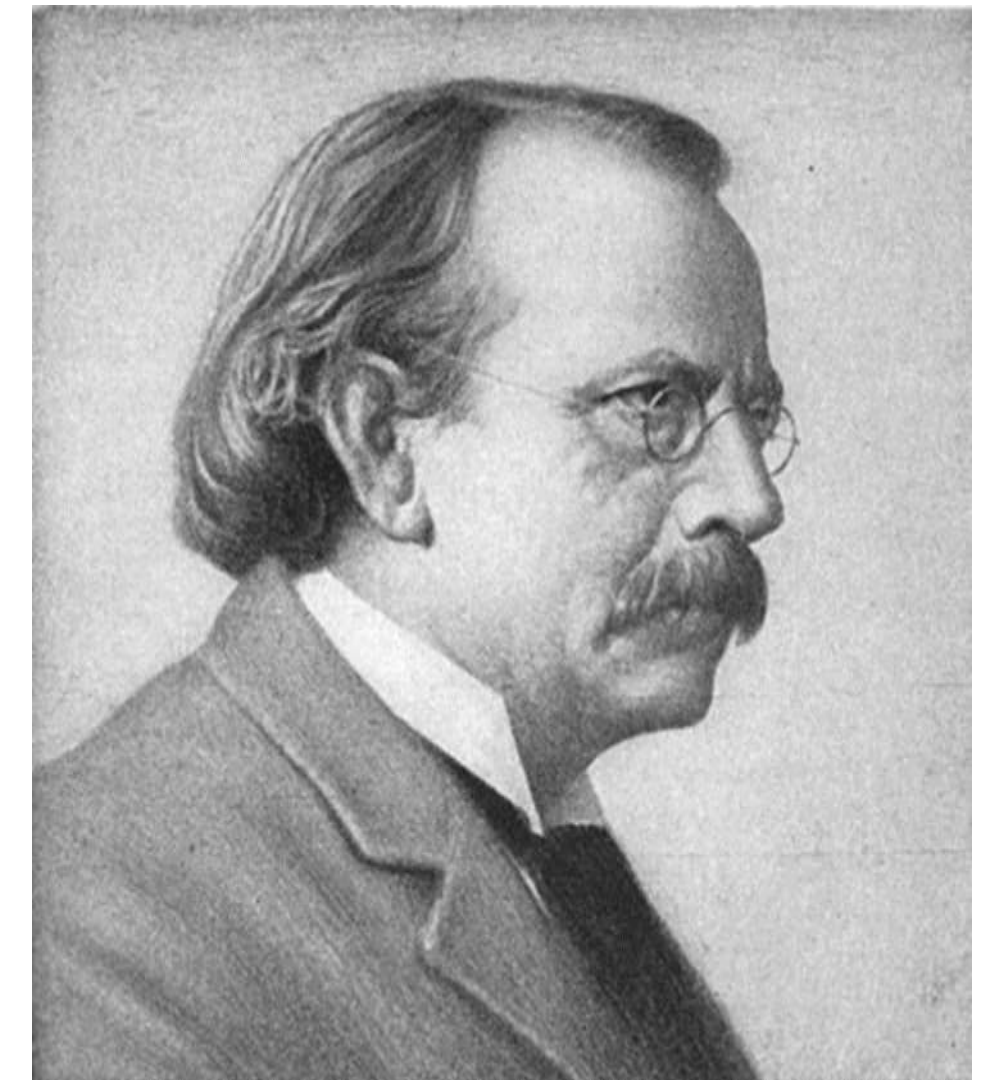
Необходимо внедрить новые диагностические технологии и алгоритмы, которые могли бы обеспечить высокую скорость (не более нескольких часов), большую производительность, достаточную чувствительность и экономическую доступность клинико-микробиологического анализа.

Одной из самых перспективных технологий таксономической идентификации микроорганизмов является масс-спектрометрическое исследование.

Масс-спектрометрический метод исследования:

Джозеф Джон Томсон (Кавендишевская лаборатория Кембриджского университета): благодаря ему и его коллегам в 1897 г. был открыт электрон. В дальнейшем (в 1912 г.) это позволило ученому создать первый масс-спектрометр для изучения влияния электрического и магнитного полей на ионы, генерируемые в остаточном газе на катоде рентгеновской трубки. Дж. Томсон заметил, что эти ионы движутся по параболическим траекториям, зависящим от отношения их массы к заряду.

В 1906 г. Дж. Томсон был удостоен Нобелевской премии по физике за вклад в теоретическое и экспериментальное исследование электропроводимости газов.



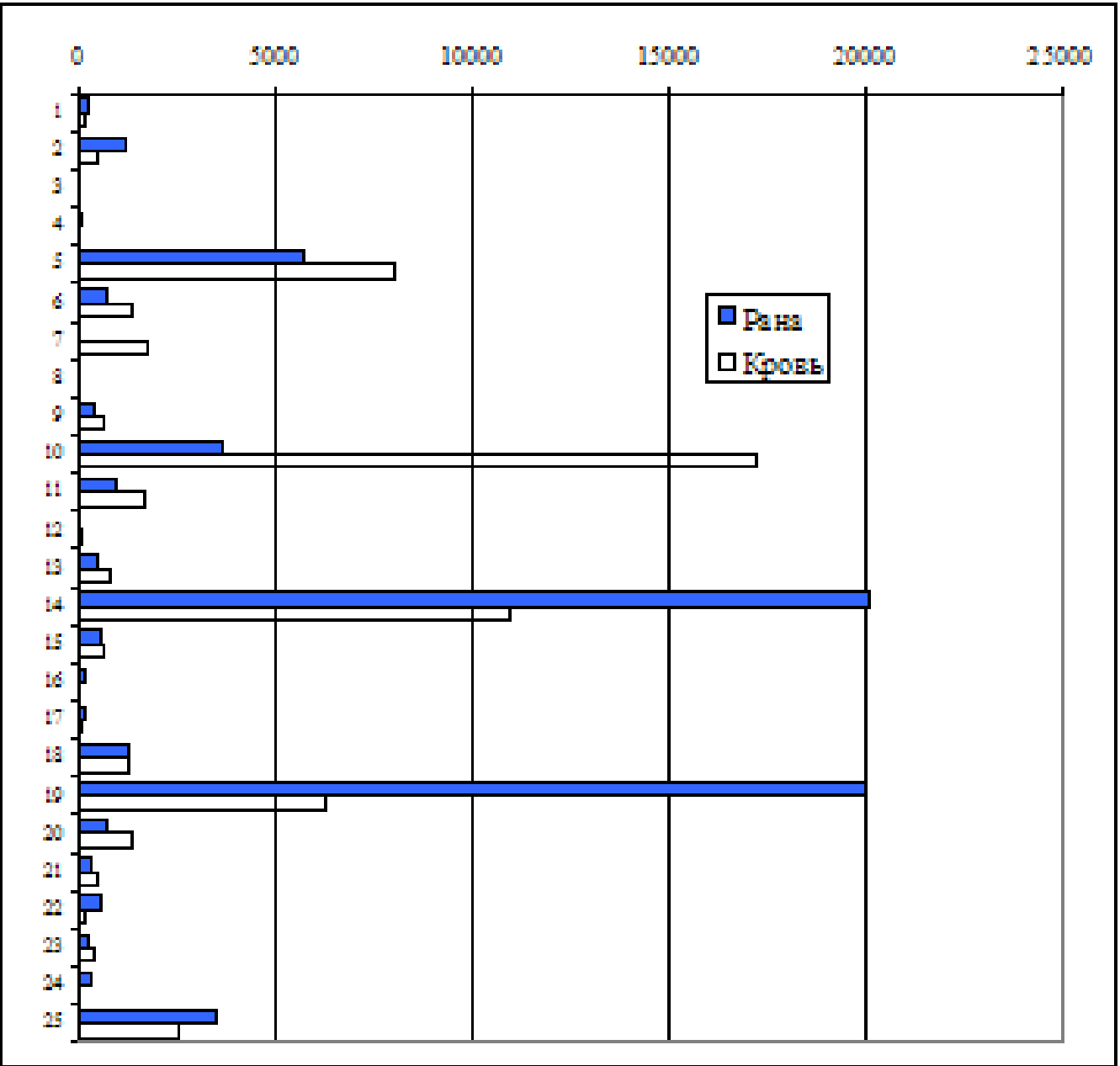
Джозеф Джон Томсон Корзин
Георгий

Масс-спектрометрический метод исследования:

В 1946 году Уильямом Стивенсом предложена концепция время-пролетных анализаторов, способных разделять ионы путем измерения скоростей их движения по прямому пути к коллектору.

В 1950-е годы впервые были соединены газовый хроматограф и масс-спектрометр (Голке, Маклаферти и Рихаге) – что послужило внедрению метода газовой хромато-масс-спектрометрии.

№	Microorganism	Relative RFU	
		Wound	Blood
1	Streptococcus	284	127
2	Enterobacteriaceae	1131	461
7	Peptostreptococcus anaerobius	11	4
12	Clostridium propionicum	36	4
18	Clostridium ramosum	5678	825
19	Enterobacter	713	1357
24	Staphylococcus intermedius	4	1729
25	Parapharyngococcus	4	4
26	Carinobacterium CMC-group XX	305	574
27	Lactobacillus	305	1729
29	Candida	138	1659
30	Escherichia	4	43
32	CLABSI	405	704
35	Enterobacter spp	20124	10318
37	Staphylococcus	567	456
38	Haemophilus	146	4
40	Clostridium perfringens	98	51
41	Enterobacter	1254	1285
43	Propionibacterium spp	20016	4264
44	Streptococcus	719	1212
46	Mycoplasma, mycoides	312	471
48	Prionomicrobium	506	162
49	Mycoplasma, mycoides	221	311
54	Enterobacter	284	4
55	Acinetobacter baumannii	3500	2538



Масс-спектрометрический метод исследования:

Создание масс-спектрометрического метода анализа сложных биоорганических соединений путем десорбции ионов из органической матрицы импульсным лазерным излучением – MALDI – (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization), было удостоено Нобелевской премии по химии (2002 год.)

Для идентификации молекул биологических объектов данный метод применяют в сочетании с технологией TOF (time off light) – разделения ионов в вакууме на основе разного времени их пролета. С помощью технологии MALDI-TOF идентифицируют вид, род патогена.

Масс-спектрометрический метод исследования:



Масс-спектрометрический метод исследования:

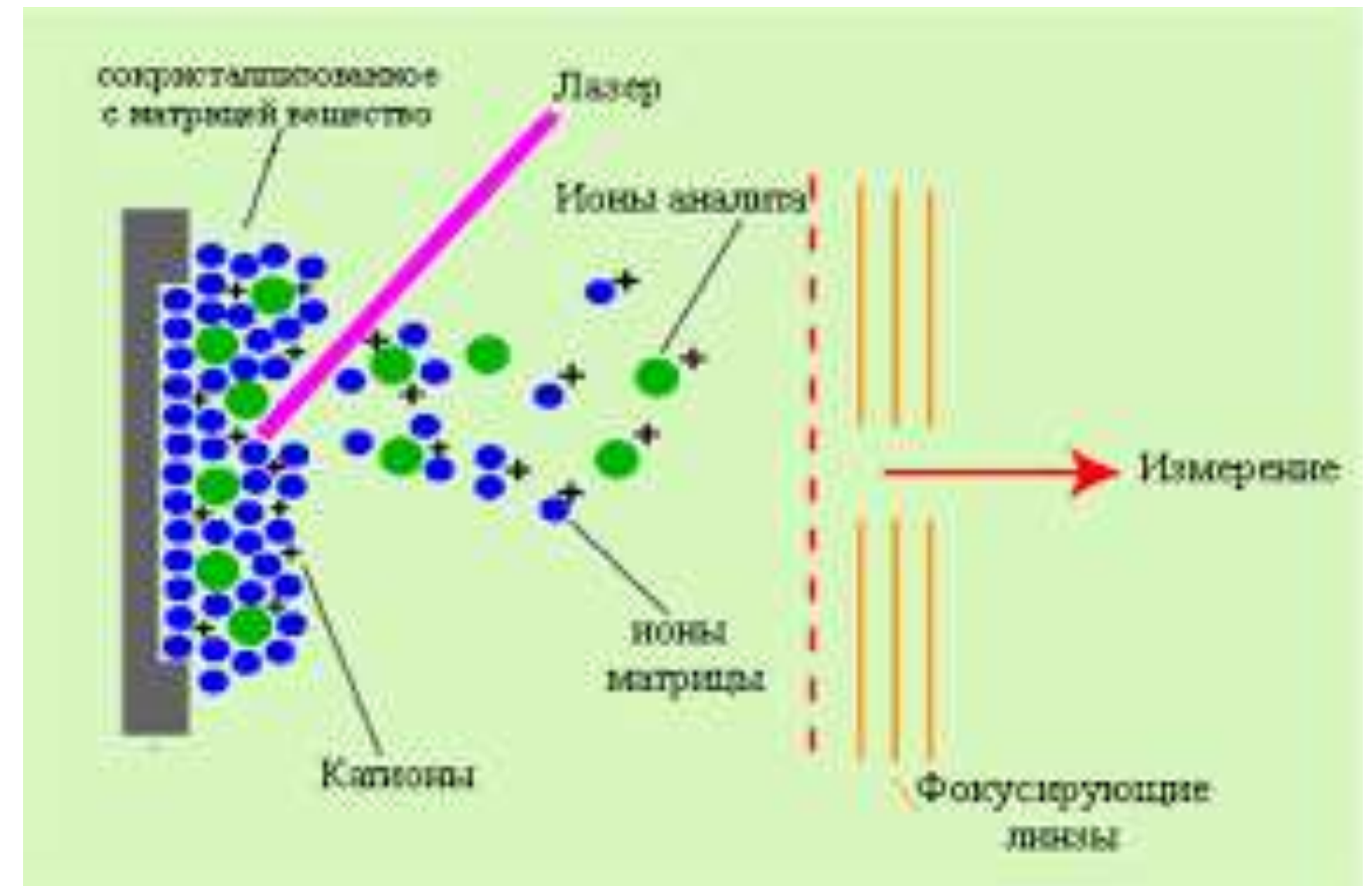
MALDI-ToF MS – автоматизированная молекулярная платформа, которая представляет собой быстрый, простой и недорогой метод видовой идентификации бактерий и грибов.

В настоящее время созданы системы и базы данных для постоянного использования в микробиологических лабораториях. Идентификация микробных изолятов с помощью MALDI-ToF MS базируется на принципе «отпечатка пальцев» (finger print); основывается на сравнении полученных масс-спектров бактерий с масс-спектрами из баз данных, дискриминационная способность по видам варьирует в зависимости от метода и полноты используемой базы данных



Масс-спектрометрический метод исследования:

- В настоящее время исследователям доступны усовершенствованные протоколы пробоподготовки, идет тестирование смесей растворителей с различными концентрациями и соотношениями для получения лизата клеток, анализируются используемые для ионизации образца матрицы, изучается воспроизводимость масс-профилей как для отдельного штамма, так и на уровне родов и видов бактерий – то есть идет оптимизация этого очень востребованного в микробиологии метода.

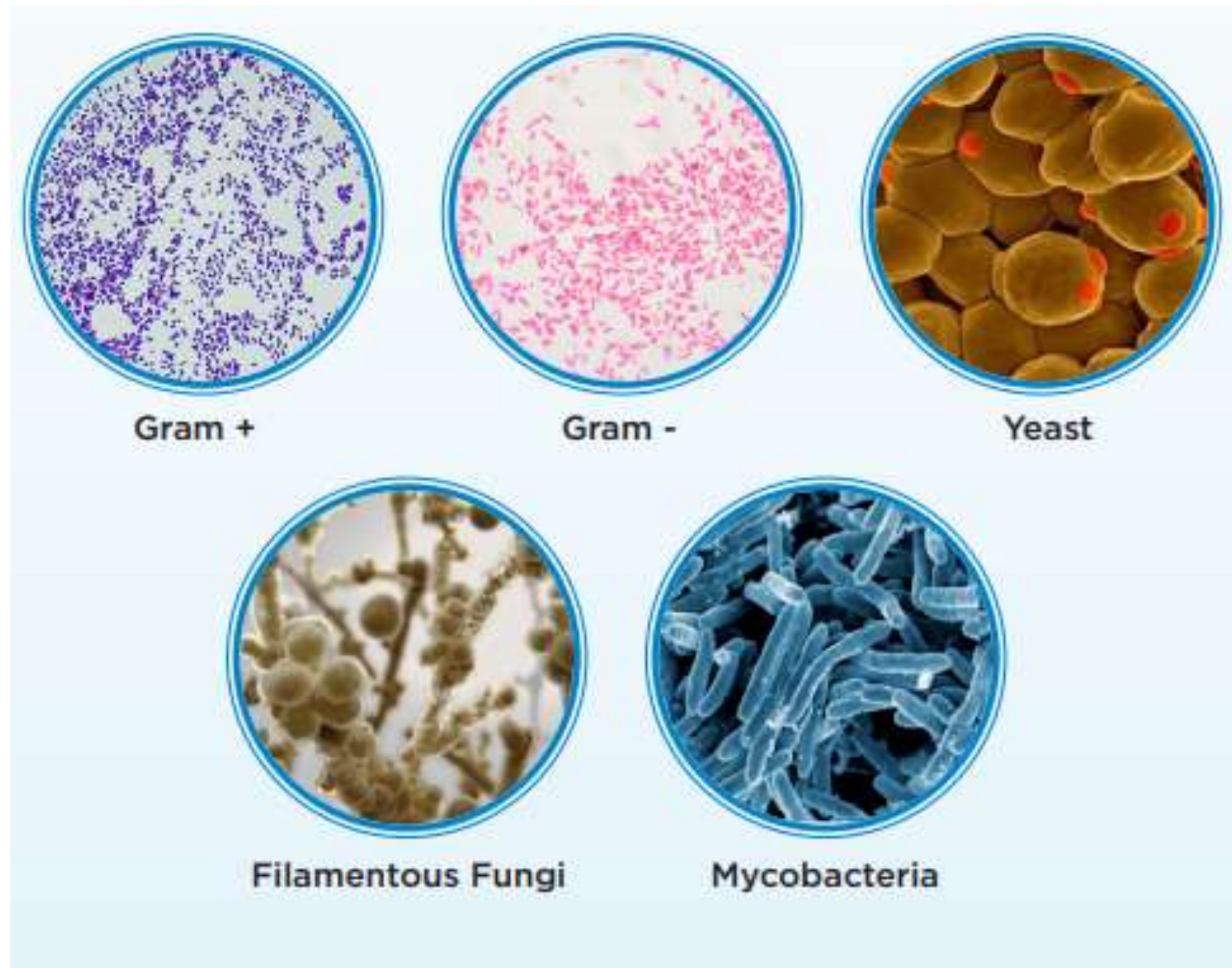


Масс-спектрометрический метод исследования:

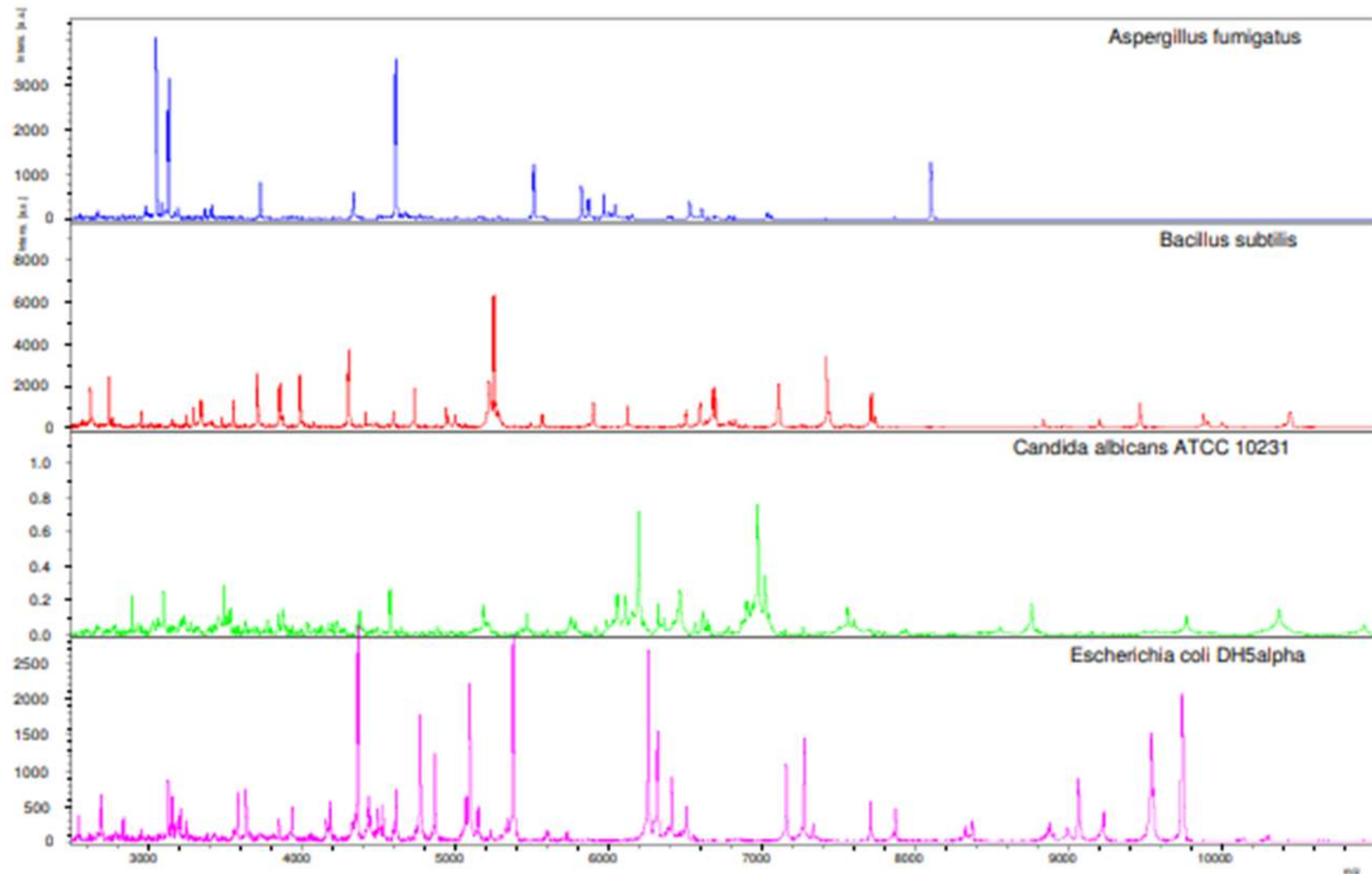
- Уникальность масс-спектрометра
- Светостабильные реагенты, готовые к использованию.
- Не требуется дополнительная подготовка реагентов.
- Не надо проводить исследования стабильности реагентов.
- Программное обеспечение автоматически генерирует отчет.



Масс-спектрометрический метод исследования:

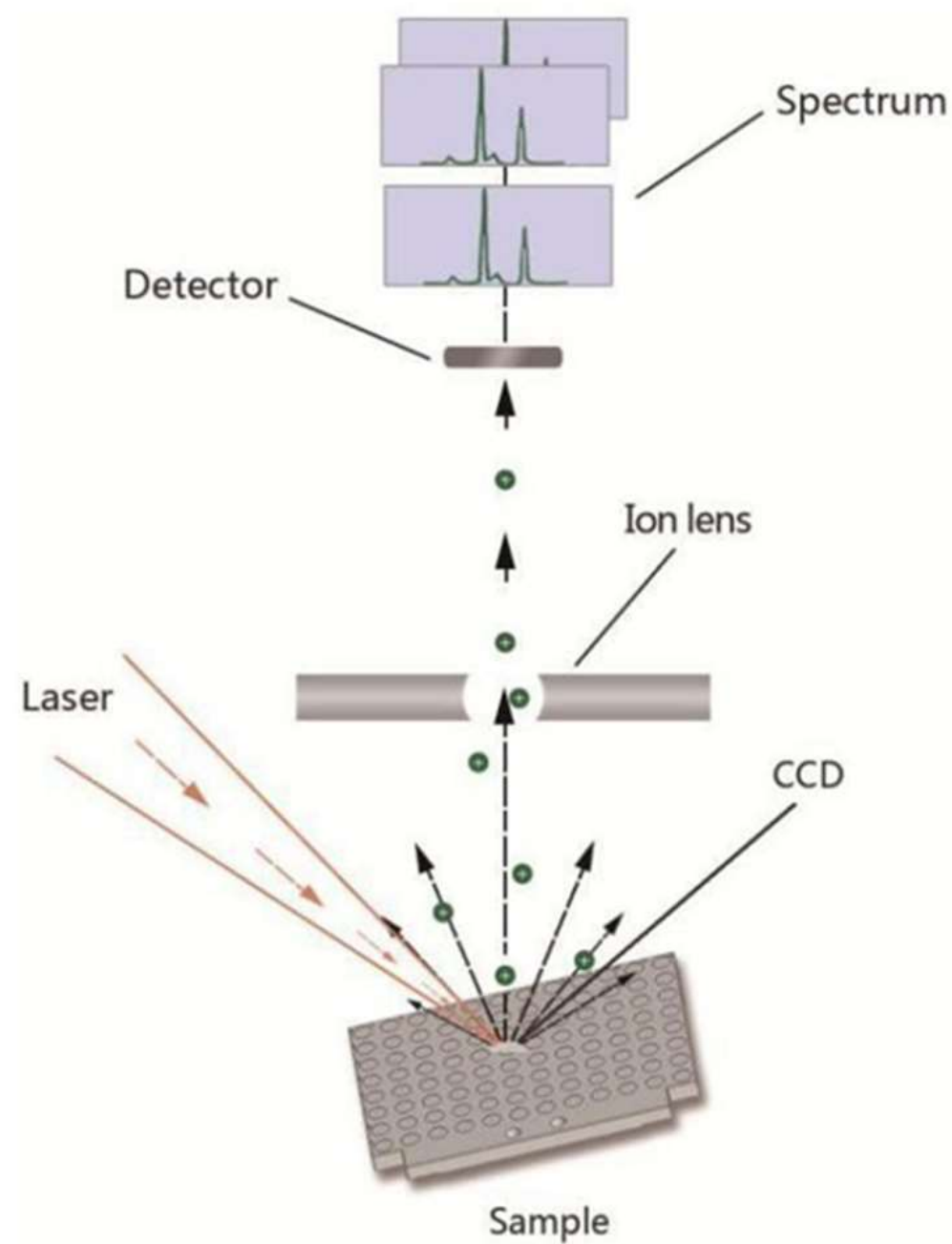


С помощью масс-спектрометрического метода можно идентифицировать более 800 родов, 4200 видов грамположительных и грамотрицательных бактерий, микобактерии и грибы.

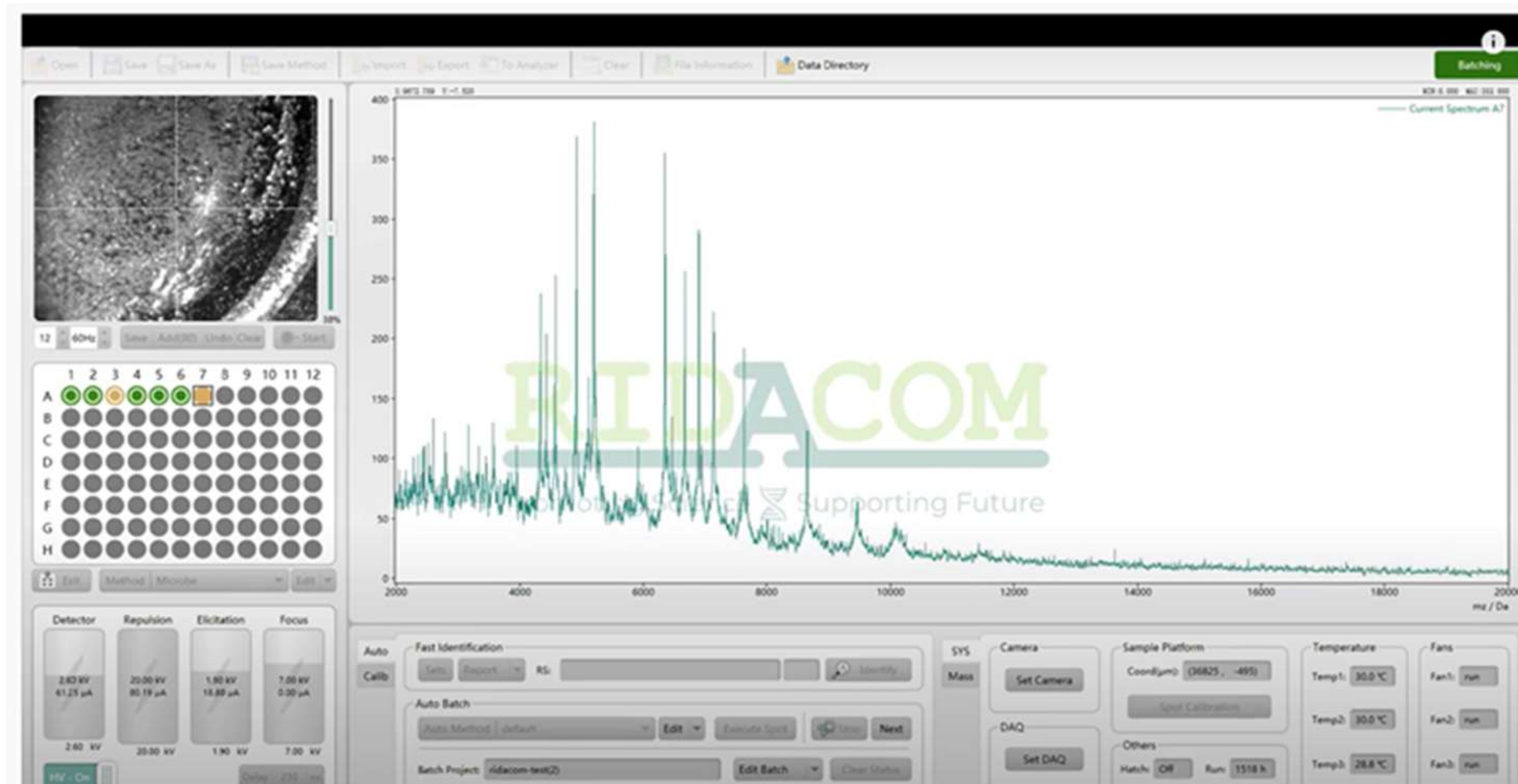


Масс-спектры плесневых грибов ; бацилл, грибов рода Кандида, кишечной палочки
База данных содержит информацию по масс-спектрам 15 000 микроорганизмов; данная база постоянно обновляется

Масс-спектрометрический метод исследования:



- 1. Колония микроорганизма (аналит) наносится на стальную пластину,**
- 2. На аналит, распределённый по поверхности носителя, наносится матрица.**
- 3. Аналит, сокристаллизованный с матрицей, многократно обстреливают лазером.**
- 4. В результате матрично-активированной лазерной ионизации происходит протонирование и десорбция компонентов аналита.**



- 1. Ионы пролетают во времяпролетной трубе с разной скоростью, обратно пропорциональной значениям m/z (лёгкие быстрее).**
- 2. На выходе из времяпролётной трубы расположен детектор, регистрирующий каждый вылетающий ион.**
- 3. Детектор выстраивает масс-спектральный фингер – принт-индивидуальный профиль компонентов анализа с разным соотношением m/z .**
- 4. Идентифицируются рибосомальные белки и белки «домашнего хозяйства», молекулярная масса которых не превышает 15 кДа.**

Масс-спектрометрический метод исследования:



**Неизвестный
микроорганизм**



Нанесение образца

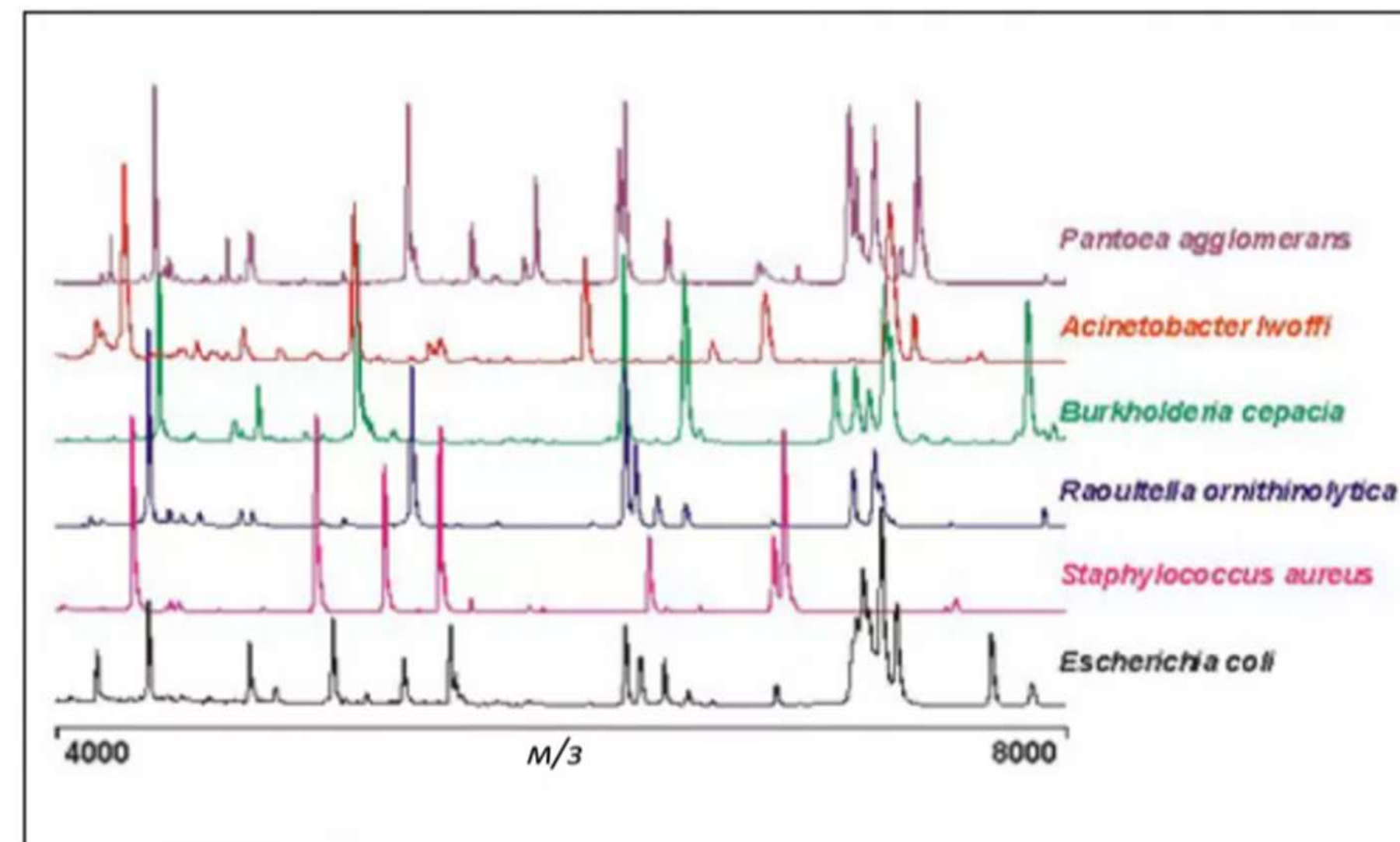


**Получение масс-
спектра**

Подготовка культуры. На подложке масс-анализатора смешивают идентифицируемые микроорганизмы (взятые из чистой культуры, отдельные колонии, среды обогащения) и раствор матрицы. Для подготовки культур требуется 10 минут, для 96 изолятов – 33 минуты.

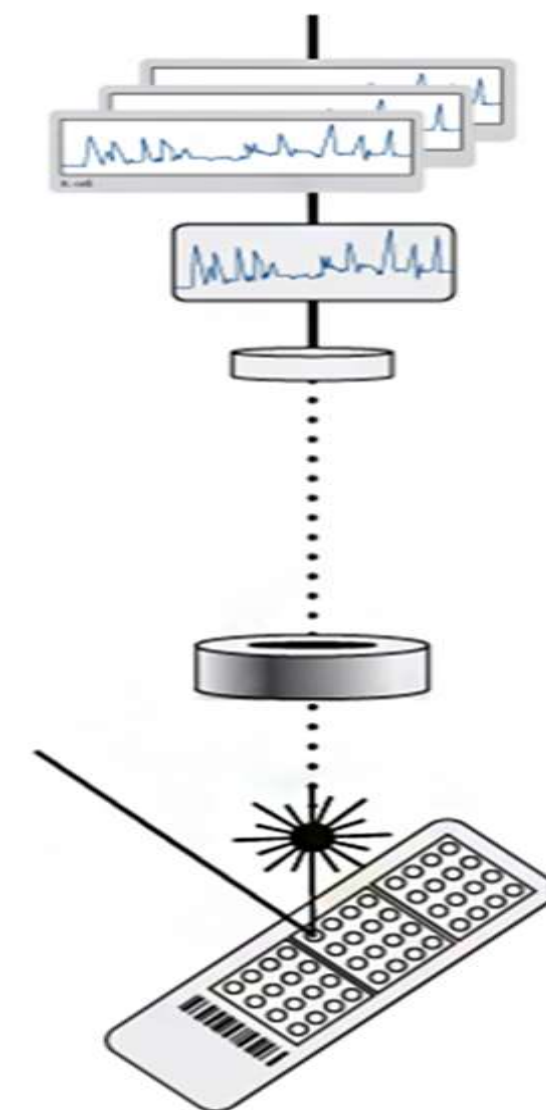
Масс-спектрометрический метод исследования:

Процесс идентификации основан на сравнении полученных масс-спектров с референсными спектрами, присутствующими в базах данных для MALDI-TOF MS. При достаточном количестве совпадений делается вывод о таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов к конкретной таксономической группе



Масс-спектрометрический метод исследования:

Проведение МС-анализа содержащихся в биологическом образце микроорганизмов возможно без предварительного культивирования, но с экстракцией из образца (кровь, моча, ликвор) микробных протеинов. МС-анализ без предварительного культивирования возможен в тех случаях, когда в исследуемом объеме образца содержится достаточное количество микроорганизмов — не менее $5 \cdot 10^5$ бактерий, но не представителей типа *Actinobacteria*, или не менее 10^6 клеток грибов или бактерий из типа *Actinobacteria*.



Масс-спектрометрический метод исследования: достоинства

- ✓ Возможность отказаться от длительной, трудоемкой фенотипической идентификации МО
- ✓ Невысокие требования к квалификации персонала
- ✓ Быстрая и простая пробоподготовка – 5 мин/образец
- ✓ Высокая чувствительность – 10^4 – 10^5 бактериальных клеток

Масс-спектрометрический метод исследования: достоинства

- ✓ Высокая скорость идентификации – 1 мин/образец, 1,5 часа при одновременном исследовании 96 проб на панели
- ✓ Высокая точность видовой идентификации
- ✓ Снижает себестоимость каждого исследования в 12-96 раз в сравнении с фенотипическими методами

Масс-спектрометрический метод исследования: недостатки

- ✓ Культивируемых микроорганизмов – 2% ; 98% - некультивируемые.
- ✓ Споры бактерий (*Bacillus spp.*) могут давать спектральные помехи
- ✓ Иногда масс-спектры не позволяют дифференцировать близкородственные микроорганизмы (*Escherichia coli* и *Shigella*, или некоторые дрожжи).
- ✓ Часть микроорганизмов не всегда могут быть идентифицированы (*Burkholderia*, *Acinetobacter*, коринебактерии и β -гемолитические стрептококки).

Масс-спектрометрический метод исследования: недостатки



1. Микроорганизмы, образующие капсулы, более устойчивы к лизису клеток (низкая экстракция белков- ошибочная или нулевая идентификация).
2. MALDI-TOF MS плохо дифференцирует *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus mitis*, а также *Haemophilus influenzae* и *Klebsiella pneumoniae*.
3. Некоторые пользователи рекомендуют проводить испытания в двух повторах и усреднять спектральный результат).
4. Питательные среды могут создавать помехи.

Масс-спектрометрический метод исследования:

Работу с пробами материалов, содержащих возбудители III—IV группы патогенности бактериальной или грибковой природы, на MALDI-TOF масс-спектрометре выполняют в микробиологической лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней"



ГЛАВНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ САНИТАРНЫЙ ВРАЧ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

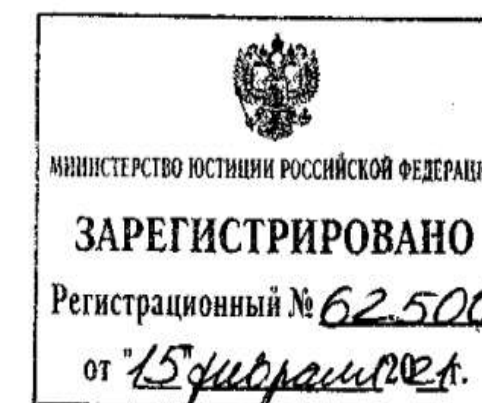
ПОСТАНОВЛЕНИЕ

28.01.2021

Москва

№ 4

Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»



В соответствии со статьей 39 Федерального закона от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (Собрание законодательства Российской Федерации, 1999, № 14, ст. 1650; 2020. № 29. ст. 4504). постановлением Правительства Российской Федерации

Пробы, явно или потенциально содержащие бактериальные и грибковые возбудители III—IV группы патогенности, подготавливаются с учетом требований санитарных правил. MALDI-TOF масс-спектрометр должен быть установлен в «заразной» зоне.

Средства индивидуальной защиты и тип дезинфицирующего раствора определяются в соответствии с действующими нормативными и методическими документами.

Масс-спектрометрический метод исследования:

Исследования методом MALDI-TOF масс-спектрометрии проводят в организациях, имеющих лицензию на право медицинской, ветеринарной, научной деятельности в областях, связанных с культивированием возбудителей III—IV группы патогенности.

Помещение, в котором установлен MALDI-TOF спектрометр, должно быть оснащено системами вентиляции и с функциями поддержания заданной температуры в диапазоне 18—24 °С.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!