

**Тема: Метод Дригальского: этапы выделения чистой культуры и ее идентификации**



- Выделение чистой культуры бактерий – обязательный этап бактериологического исследования в лабораторной диагностике.
- Метод Дригальского основан на механическом разобщении клеток.

# Метод Дригальского

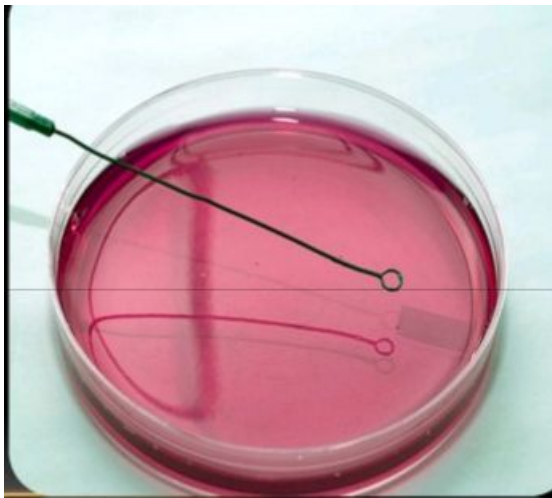
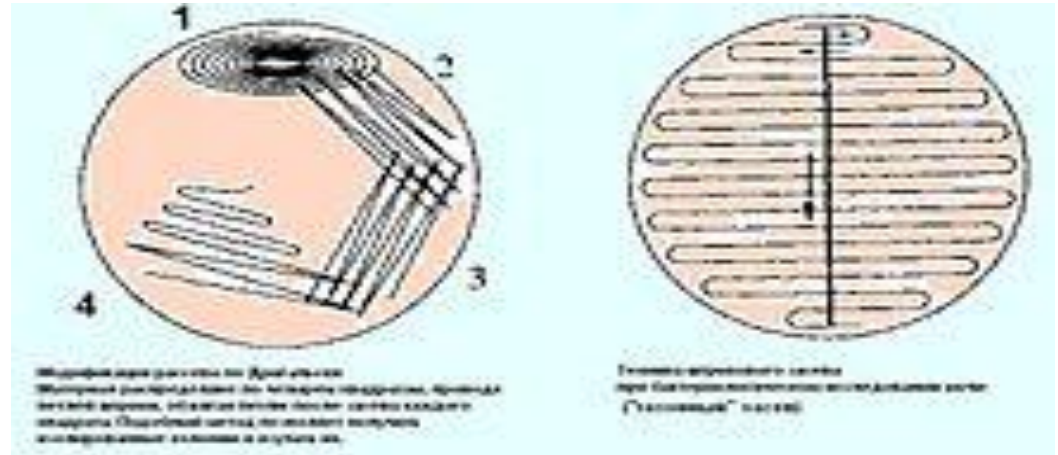
## 1-й этап.

- Рассев исследуемого материала по поверхности плотной питательной среды с целью получения изолированных колоний.
- Может включать предварительную микроскопию исследуемого материала



# 1-й этап.

## Техника посева



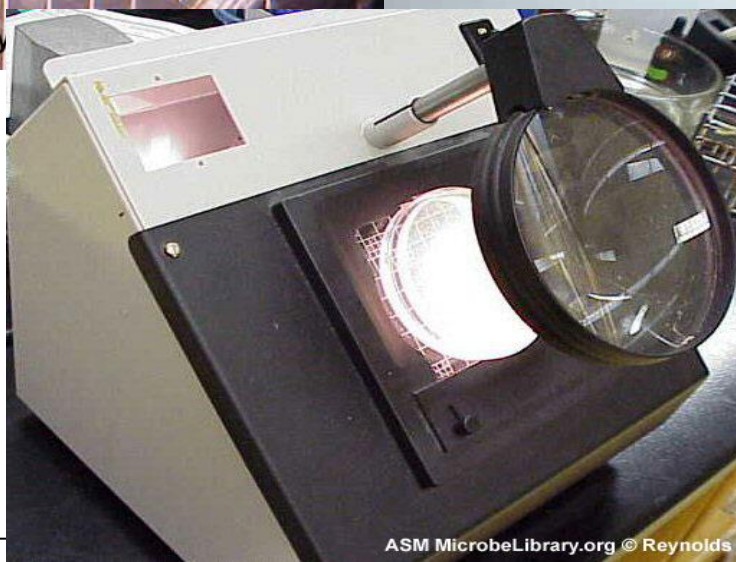
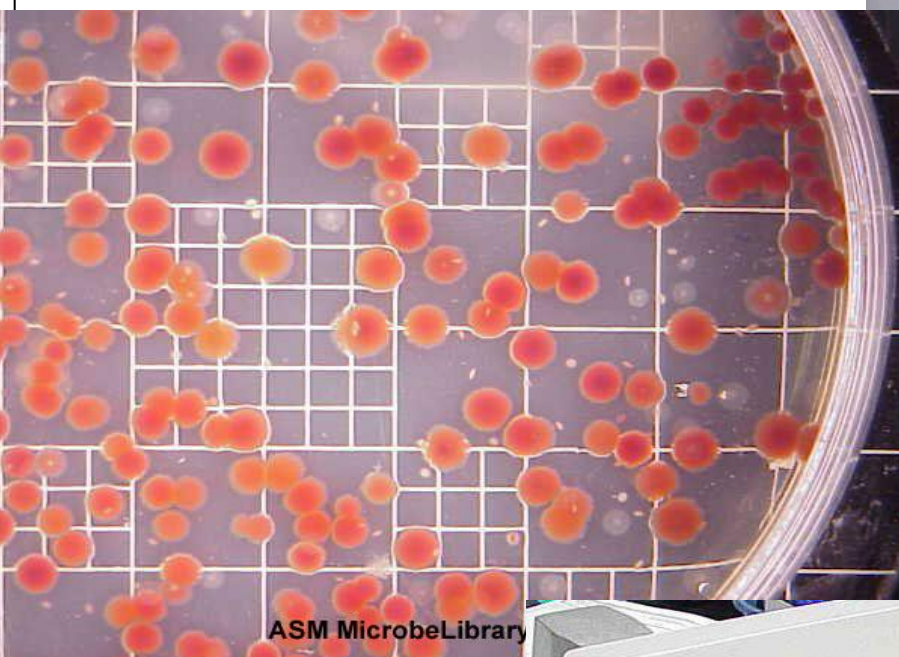
Посевы «газоном» производят на плотную питательную среду в чашке Петри. Для этого, приоткрыв левой рукой крышку, петлёй или пипеткой наносят посевной материал на поверхность питательного агара по методу Дригальского.



## 2-й этап.

- Макро- и микроскопическое изучение выросших колоний и отсева колонии, характерной для определенного вида на скошенный агар или чашку Петри со свежим агаром для получения чистой культуры.

По результатам посева серийных разведений исследуемого материала выбирают чашку Петри, удобную для подсчета колоний.



Подсчет колоний

# Культуральные свойства бактерий.

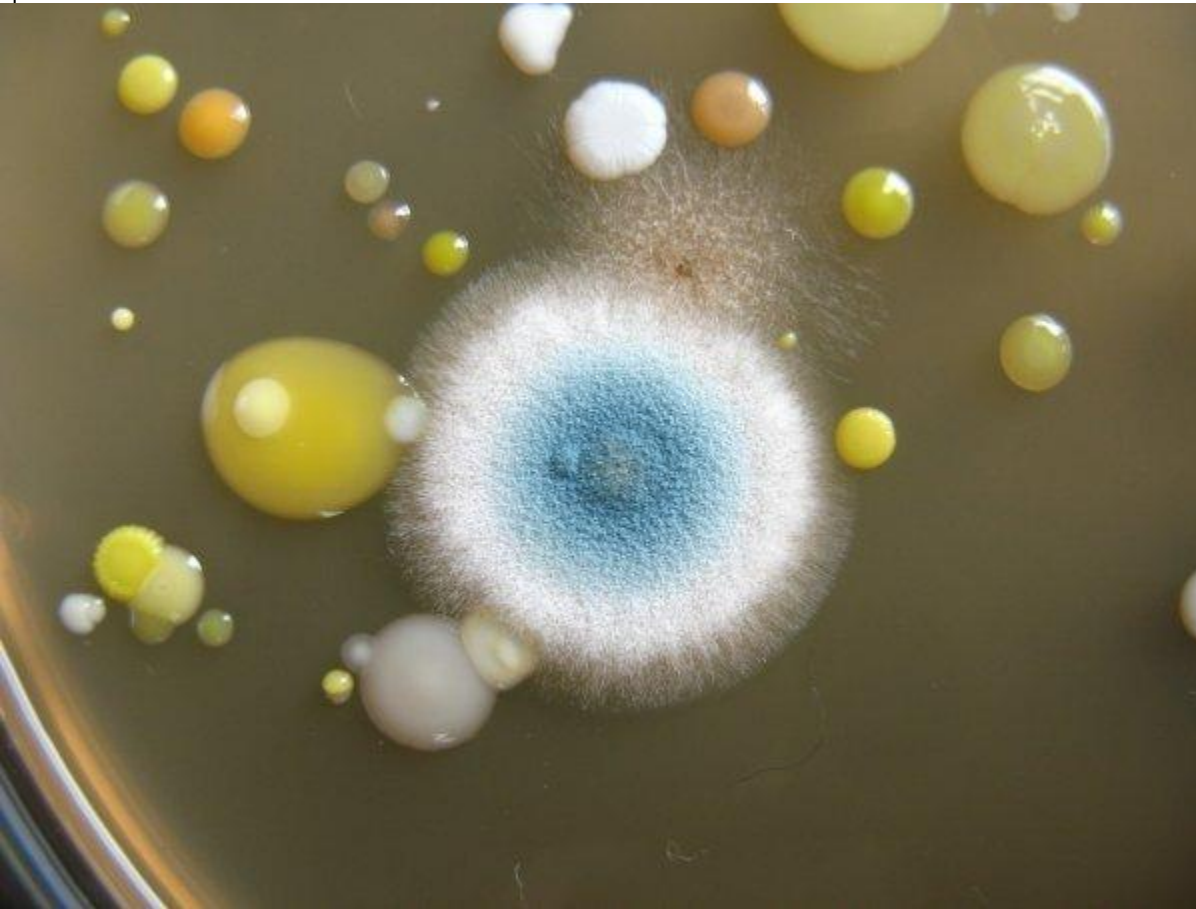
- Характер роста на жидких и плотных питательных средах.
- Влияние кислорода на рост культуры бактерий.
- Температурные границы роста культуры бактерий.
- Влияние рН питательной среды на рост культуры бактерий.



# Культуральные свойства бактерий

- Колонии различаются по величине, форме, цвету, консистенции, контуру края, структуре и характеру поверхности:
- по величине — крупные (диаметр более 4—5 мм), средние (2—4 мм) и малые (1—2 мм)
- по форме — круглые, розеткообразные, листовидные и т. д.
- по цвету, зависящему от пигмента — белого, ярко-синего, красного цветов и т. д.
- по консистенции — сухие, влажные, сочные, слизистые
- по поверхности — гладкие, морщинистые, исчерченные, плоские, выпуклые, плосковыпуклые, вдавленные
- по краю — с ровными, волнистыми, бахромчатыми краями
- по структуре — могут иметь аморфную, зернистую, волокнистую внутреннюю структуру
- в чистой культуре, выращенной на скошенном питательном агаре, характер роста может быть сухим, влажным, ползучим, складчатым, пигментированным

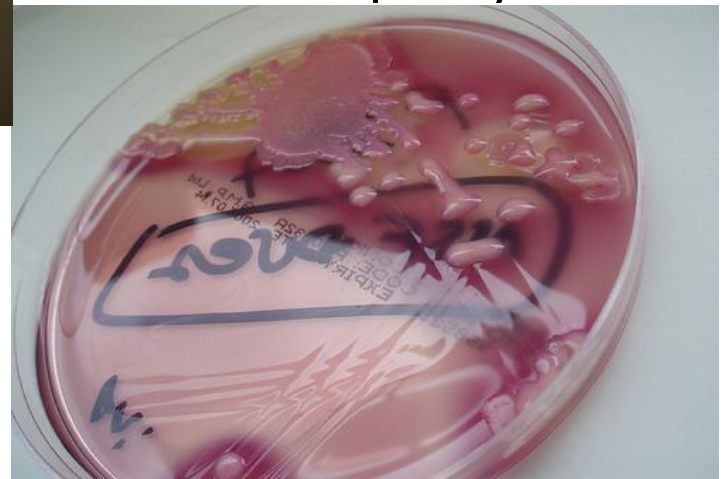
# Культуральные свойства бактерий (продолжение)



Рост изолированных колоний

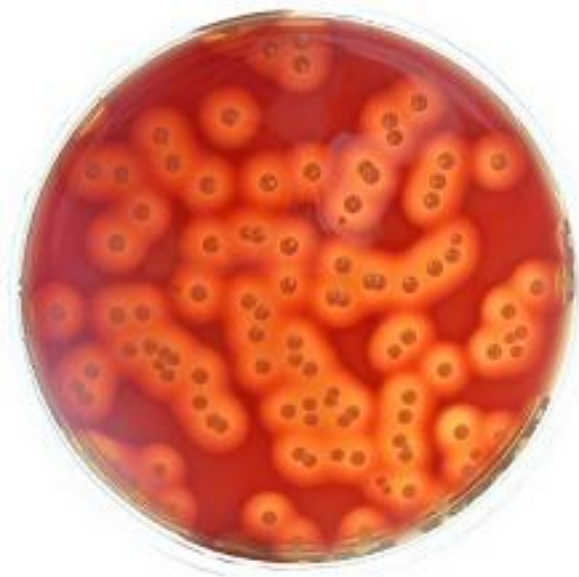


Streptomyces

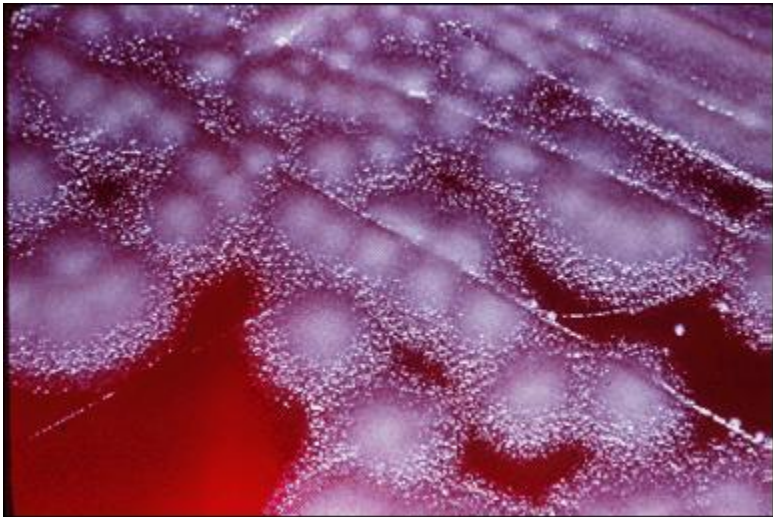


Klebsiella pneumoniae

- Культуральные свойства бактерий  
(продолжение)



*S.aureus* на кровяном агаре



Колонии *Bacillus anthracis*  
«голова медузы»



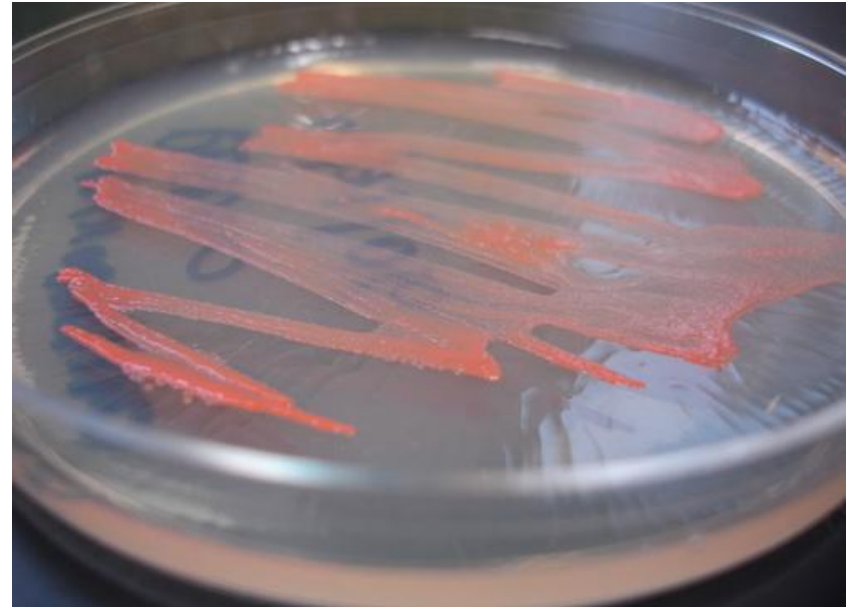
Фото К.Лавров lavrov.ko@gmail.com

Колонии возбудителя чумы *Y.pestis*  
«кружевной платочек»

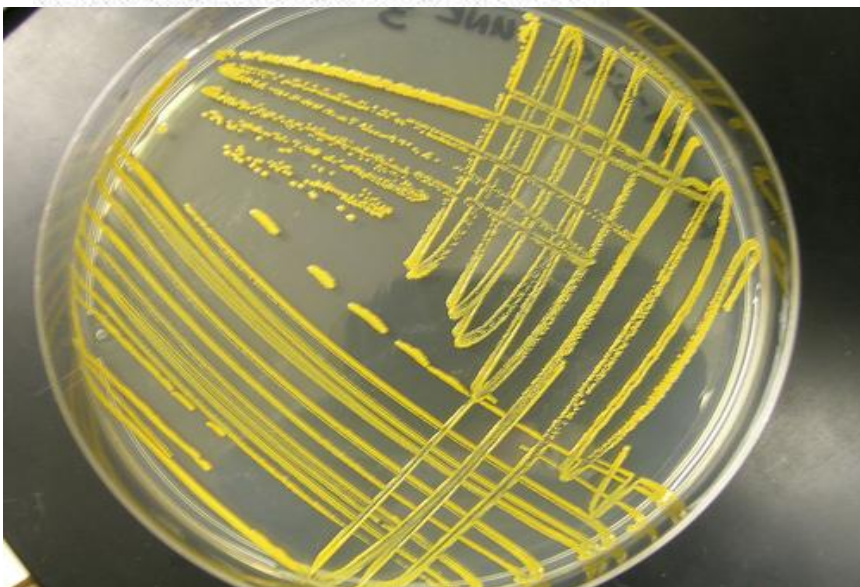
- Культуральные свойства бактерий.  
Пигменты.



Рост колоний синегнойной палочки.



Рост чистой культуры *Micrococcus roseus*



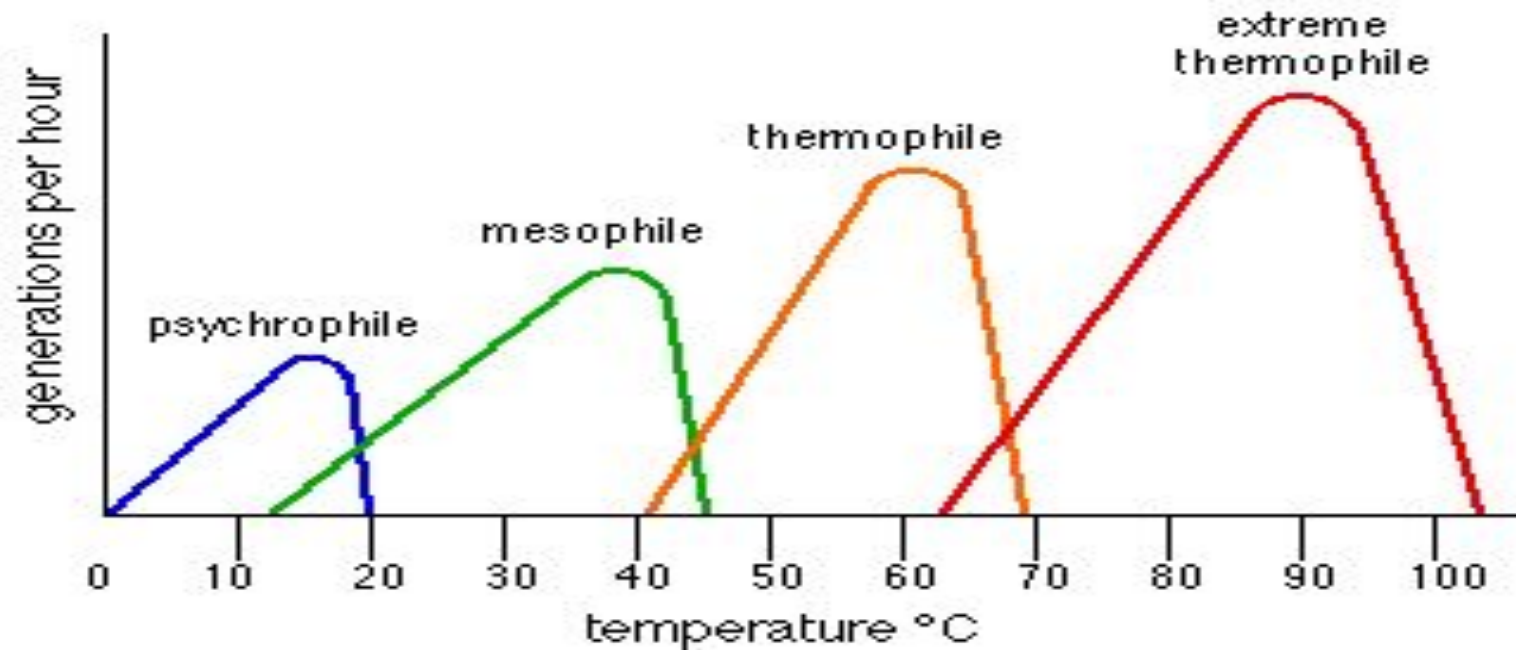
Рост чистой культуры *S. aureus*

# Культуральные свойства бактерий. Температурные границы роста.

- **ПСИХРОФИЛЫ** – оптимум от 0 до 20<sup>0</sup>С
  - Vibrio marinus
  - Pseudomonas fluorescens
  - Yersinia enterocolitica, Yersinia pestis (от 4 до 40<sup>0</sup>С)-  
*факультативные психрофилы*
- **МЕЗОФИЛЫ** - оптимум 30 - 40<sup>0</sup>С (от 10 до 45<sup>0</sup>С)
- **ТЕРМОФИЛЫ** - оптимум 45 - 65<sup>0</sup>С
  - Bacillus stearothermophilus
  - Thermoactinomyces vulgaris



# Температурные интервалы роста бактерий.

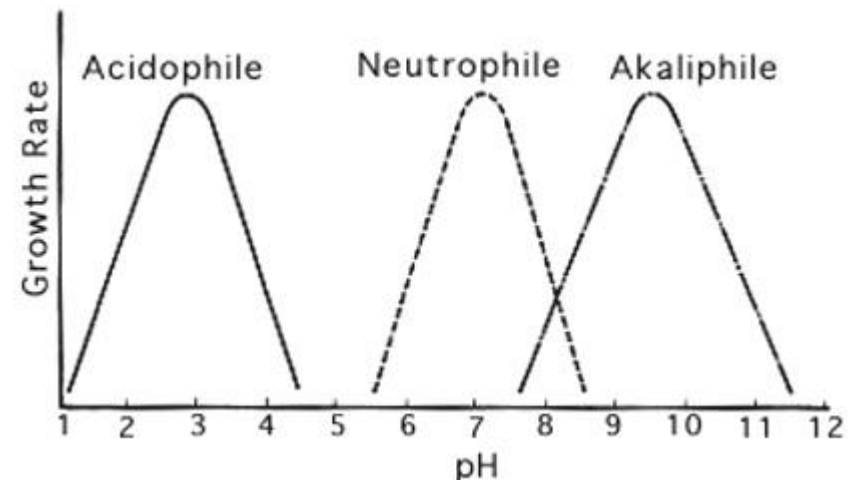


- Температура влияет на скорости ферментативных реакций, состояние мембран и поддержание конформации белков и нуклеиновых кислот.
- Для некоторых патогенных микроорганизмов повышение температуры является сигналом о попадании в организм человека, влияя на синтез их факторов патогенности.



# Влияние pH питательной среды на рост культуры бактерий.

- Подавляющее большинство микроорганизмов хорошо растёт при нейтральном pH – *нейтрофилы*
- Актиномицеты и бактерии, разлагающие мочевины, предпочитают среды с более высоким pH - *алкалифилы (Vibrio cholerae)*
- Некоторые бактерии (например, M.tuberculosis, лактобациллы) и грибы толерантны к кислой среде - *ацидофилы*



# Метод Дригальского 3-й этап.

Задача 3 этапа – идентификация- определение вида – выделенной чистой культуры по комплексу биологических свойств:

- Морфологических
- Тинкториальных
- Культуральных
- Биохимических
- Антигенных
- Токсигенных
- Чувствительности к антибиотикам и др. лекарственным препаратам
- Чувствительности к типовым диагностическим фагам



- Микроскопия может предоставить лишь информацию о форме бактерий и их расположении в мазке, типе клеточной стенки и способности к спорообразованию, что явно недостаточно для различения десятков тысяч видов микроорганизмов.
- Дополнительную информацию может предоставить учет культуральных свойств – характера роста микроорганизмов на питательных средах. Современные дифференциально-диагностические среды, сочетающие различные хромогенные субстраты и индикаторы, позволяют на этапе первичного посева из исследуемого материала определять по культуральным свойствам отдельные наиболее значимые таксономические группы. Однако, они также не способны решить задачу определения вида для произвольной выделенной чистой культуры.
- Полноценная видовая идентификация может производиться с использованием различных подходов. Некоторые из них применяются только в пределах отдельной таксономической группы – например, идентификация по антигенным свойствам для представителей рода *Streptococcus*. Но некоторые из подходов возможно использовать и для видовой идентификации широкого круга микроорганизмов:

# Видовая идентификация

## 1. Биохимическая идентификация

Биохимическая идентификация выделенной чистой культуры заключается

- в определении спектра ее ферментативной активности,
- способности к сбраживанию определенных субстратов
- или синтез тех или иных конечных продуктов.

# Пример определения ферментативной активности на тест-системах арі



Тест-система с сухими дифференциально-диагностическими средами заполняется суспензией из чистой культуры бактерий и инкубируется в термостате



Вид системы для энтеробактерий после инкубации. Верхний планшет – все тесты положительны, нижний – все отрицательны.



Вид системы для стафилококков после инкубации. Верхний планшет – все тесты положительны, нижний – все отрицательны.

Через 18-24 часа проводится учёт цвета лунок и соотнесение полученных результатов с базой данных, которая может представлять собой как книгу, так и компьютерную программу

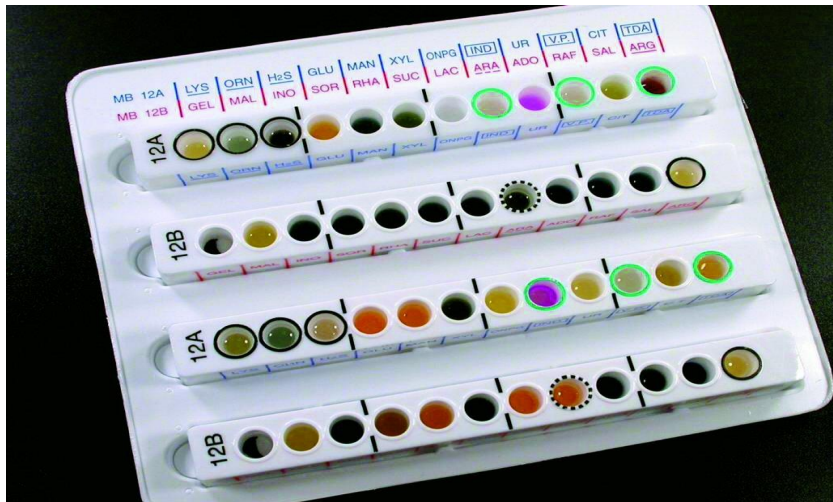
## Интерпретационная таблица

| Тесты            | Субстраты                  | Реакции/ферменты             | Результат отрицательный | Результат положительный |
|------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| ONPG             | орто-нитрофенил-галактозид | В-галактозидаза              | бесцветный              | желтый                  |
| ADN              | аргинин                    | Аргинин-дегидролаза          | желтый                  | красный/оранжевый       |
| LDC              | лизин                      | Лизин-декарбоксилаза         | желтый                  | Оранжевый/красный       |
| ODC              | орнитин                    | Орнитин-декарбоксилаза       | желтый                  | красный/оранжевый       |
| CIT              | цитрат Na                  | Утилизация цитрата           | светло-зеленый/желтый   | синий                   |
| H <sub>2</sub> S | тиосульфат Na              | Образование H <sub>2</sub> S | бесцветный              | черный осадок           |
| URE              | мочевина                   | Уреаза                       | желтый                  | красный/оранжевый       |
| TDA              | триптофан                  | Триптофан-деаминаза          | желтый                  | темно-коричневый        |
| IND              | триптофан                  | Индолообразование            | светло-зеленый/желтый   | красный                 |
| VP               | пируват Na                 | Продукция ацетона            | бесцветный              | розовый/красный         |
| GEL              | желатина                   | Желатиназа                   | бесцветный              | черный                  |
| GLU              | глюкоза                    | Ферментация/окисление        | синий/сине-зеленый      | желтый                  |
| INO              | инозит                     | - « - « -                    | - « -                   | - « -                   |
| MAN              | маннит                     | - « - « -                    | - « -                   | - « -                   |
| SOR              | сорбит                     | - « - « -                    | - « -                   | - « -                   |
| RHA              | рамноза                    | - « - « -                    | - « -                   | - « -                   |
| SAC              | сахароза                   | - « - « -                    | - « -                   | - « -                   |
| MEL              | мелибиоза                  | - « - « -                    | - « -                   | - « -                   |
| AMY              | амигдалин                  | - « - « -                    | - « -                   | - « -                   |
| ARA              | арабиноза                  | - « - « -                    | - « -                   | - « -                   |



# Рapid-системы для биохимической идентификации

- Используют хромогенные субстраты, которые дают окрашенные продукты при их расщеплении бактериальными ферментами



- Как и при использовании классических дифференциально-диагностических сред лунки заполняют суспензией бактерий
- Результат учитывают **через 4 часа**

# Автоматические системы биохимической идентификации



■ Анализатор для идентификации микроорганизмов и определения чувствительности к антибиотикам VITEK 2 Compact 30

- Система, подобная МикроТакс, включает
- ридер МТ-1 - 8-канальный фотометр для считывания планшет со встроенным шейкером и жидкокристаллическим дисплеем
- инкубатор МТ-5 (внутренняя камера которого выполнена из нержавеющей стали) с жидкокристаллическим дисплеем
- автоматическая 8-канальная электронная пипетка с зарядным устройством;
- управляющий блок на базе персонального компьютера с программным обеспечением и принтером.

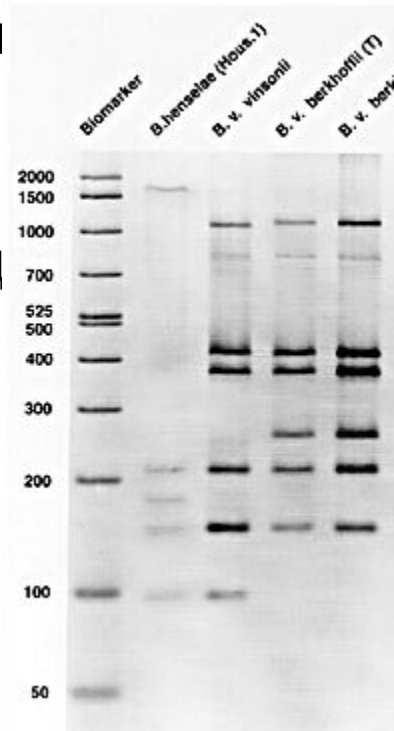
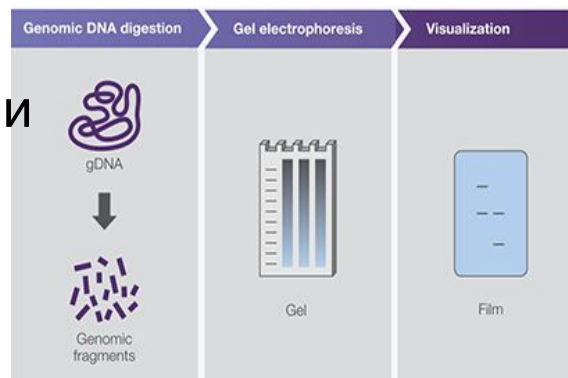


# Методы, используемые для внутривидовой идентификации бактерий

- **2. Рестрикционный анализ** основан на применении ферментов рестриктаз - эндонуклеазы, которые расщепляют молекулы ДНК, разрывая фосфатные связи в определенных последовательностях нуклеотидов.
- В геноме конкретной таксономической единицы находится строго определенное (генетически задетерминированное) число участков узнавания для определенной рестриктазы.
- Если выделенную из конкретного микроба ДНК обработать определенной рестриктазой, то это приведет к образованию строго определенного количества фрагментов ДНК фиксированного размера.
- Размер каждого типа фрагментов можно узнать с помощью электрофореза в агарозном геле

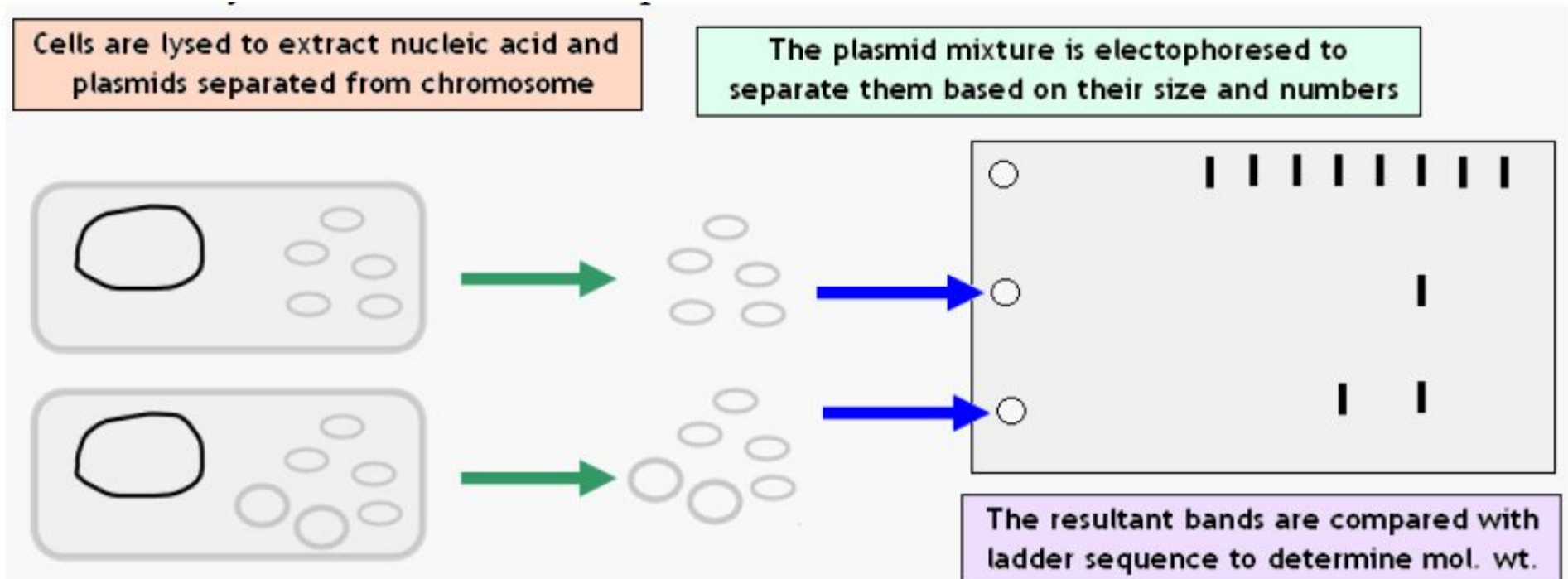
• Гель окрашивают бромистым этидием и фотографируют в УФ-излучении.

• Таким способом можно получить рестрикционную карту определенного вида микробов



# Методы, используемые для внутривидовой идентификации бактерий

- **3. Определение плазмидного профиля бактерий.**
- Для этого из бактериальной клетки выделяют плазмидную ДНК, которую разделяют электрофорезом в агарозном геле для определения количества и размеров плазмид.

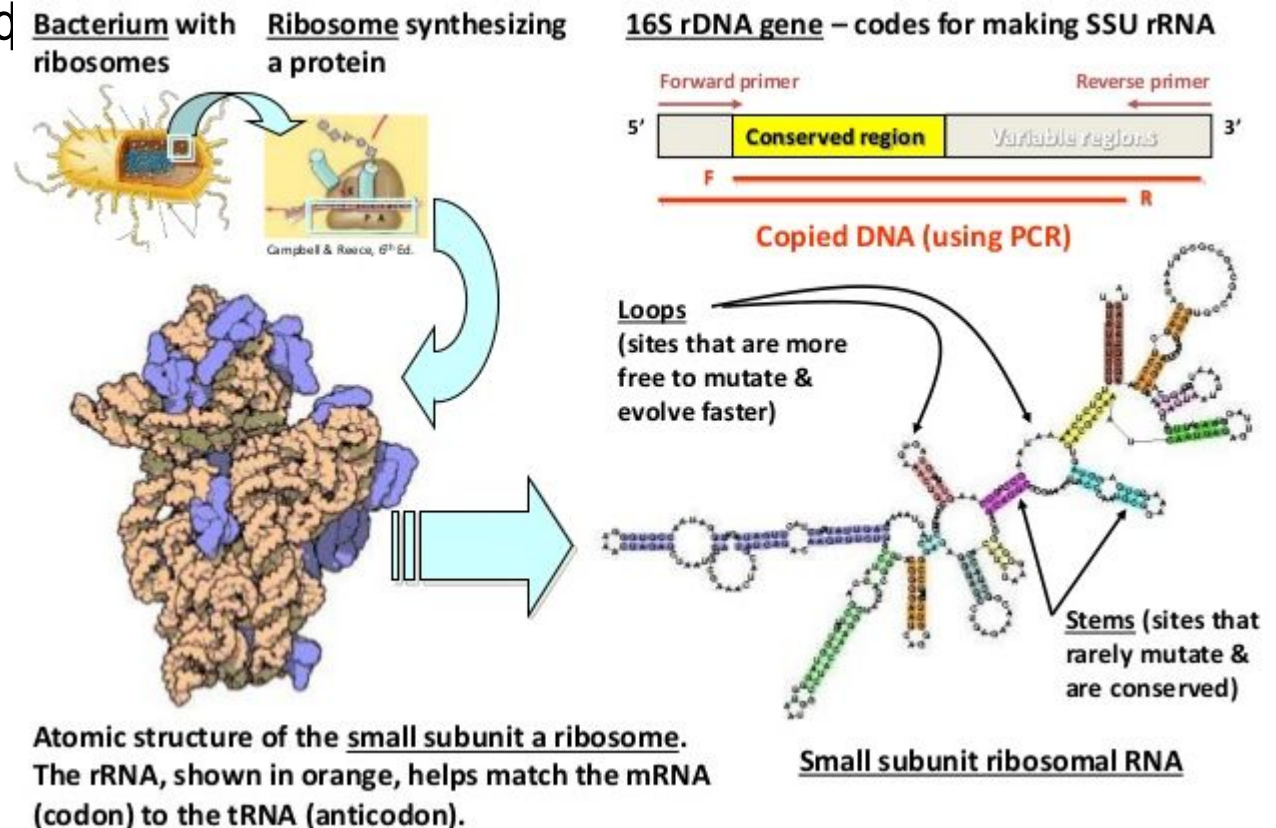


# Методы, используемые для внутривидовой идентификации бактерий

## ● 4. Риботипирование.

- Последовательность нуклеотидных оснований в оперонах, кодирующих рРНК, характеризуется наличием как **консервативных** участков, которые подверглись малым изменениям в процессе эволюции и имеют сходное строения у различных бактерий, так и **вариабельных** последовательностей, которые родо- и видо-специфичны и являются маркерами при генетической идентификации

- Эти опероны представлены на бактериальной хромосоме в нескольких копиях.



# Методы, используемые для внутривидовой идентификации бактерий

## ● 4. Риботипирование.

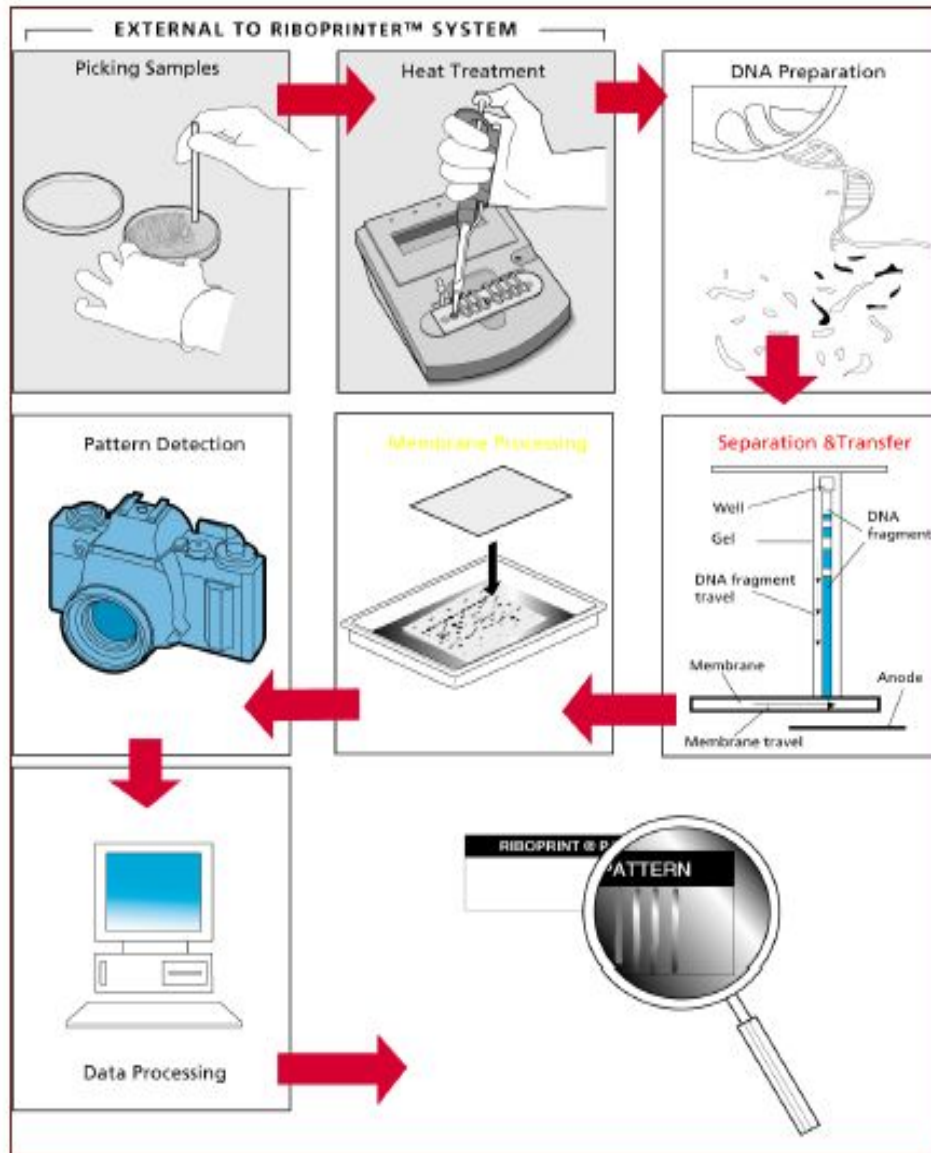
- Фрагменты ДНК, полученные после обработки ее рестриктазами, содержат последовательности генов рРНК, которые могут быть обнаружены методом молекулярной гибридизации с меченой рРНК соответствующего вида бактерий.
- Количество и локализация копий оперонов рРНК и рестрикционный состав сайтов как внутри рРНК-оперона, так и по его флангам варьируют у различных видов бактерий.
- На основе этого свойства построен метод *риботипирования*, который позволяет производить мониторинг выделенных штаммов и определение их вида.
- В настоящее время риботипирование проводится в автоматическом режиме **RiboPrinter® - система для идентификации бактерий**

Полный автоматический протокол RFLP (ПДРФ) в течение 8 часов

- ПДРФ – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов



# Как работает система RiboPrinter®



## Ручные операции

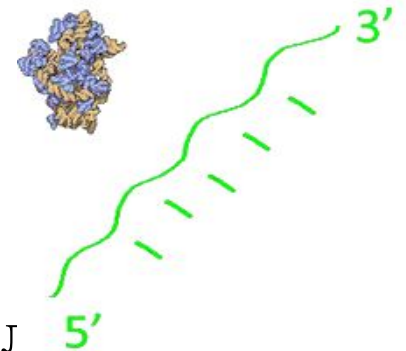
- Отбор колоний с чашки Петри
- Лизис и выделение ДНК

## Автоматический анализ

- Фрагментация ДНК рестриктазой
- Разделение фрагментов и перенос их на мембрану
- Гибридизация с зондами
- Сканирование и регистрация фореграмм
- Анализ фореграмм, поиск гомологий по базе данных
- Идентификация вида и штамма бактерии

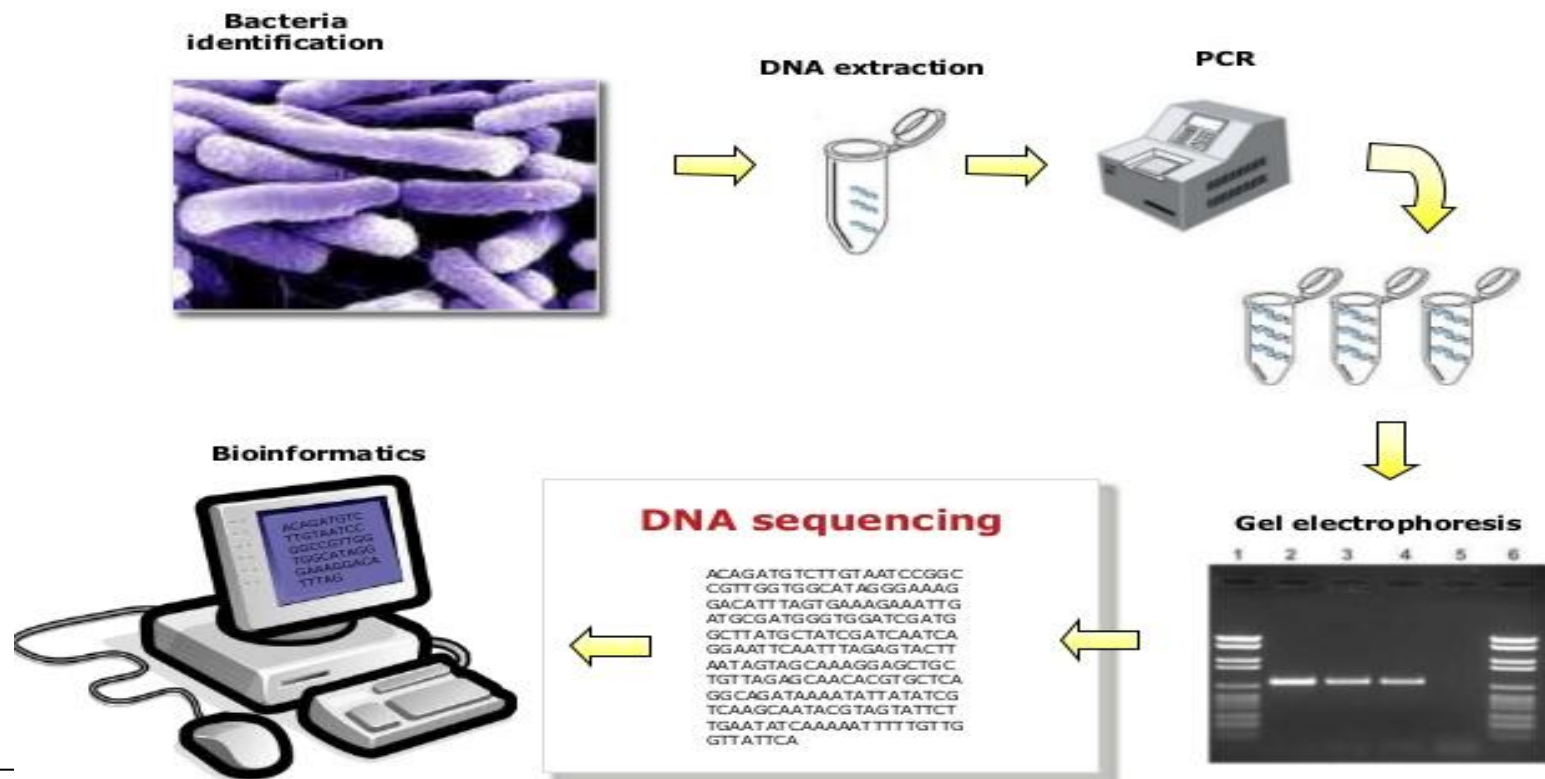
# Видовая идентификация

## 5. Секвенирование гена 16S рРНК



- - использует данные о нуклеотидных последовательностях выделенных чистых культур.
- Ген 16S рРНК выбран как универсальный маркер для видовой идентификации: он имеется в геномах всех прокариот и обладает сравнительно малой изменчивостью.
- В большинстве случаев применимо следующее правило: совпадение у двух штаммов последовательностей этого гена на 97% и более свидетельствует, что они относятся к одному виду, в противном случае – к разным.
- На сегодняшний день обязательным требованием для описания нового вида прокариот является публикация последовательности гена 16S рРНК в открытом доступе.

- Прочтение последовательности, как правило, осуществляется с помощью постановки полимеразной цепной реакции с праймерами под ген 16S рРНК с последующей очисткой ДНК и секвенированием по Сэнгеру (детально данные методы будут детально рассмотрены в разделе «Генетика бактерий»).
- Далее последовательность сравнивается с компьютерной базой данных с использованием алгоритма BLAST ([англ. Basic Local Alignment Search Tool](#) - средство поиска основного локального выравнивания).



- Метод секвенирования гена 16S рРНК является «золотым стандартом» точности видовой идентификации бактерий, обладает наибольшей воспроизводимостью, применим к прокариотам любых таксономических групп.
- Из недостатков необходимо отметить сравнительную трудоемкость и длительность данного подхода, а также требование специализированной аппаратуры для полимеразной цепной реакции и секвенирования.

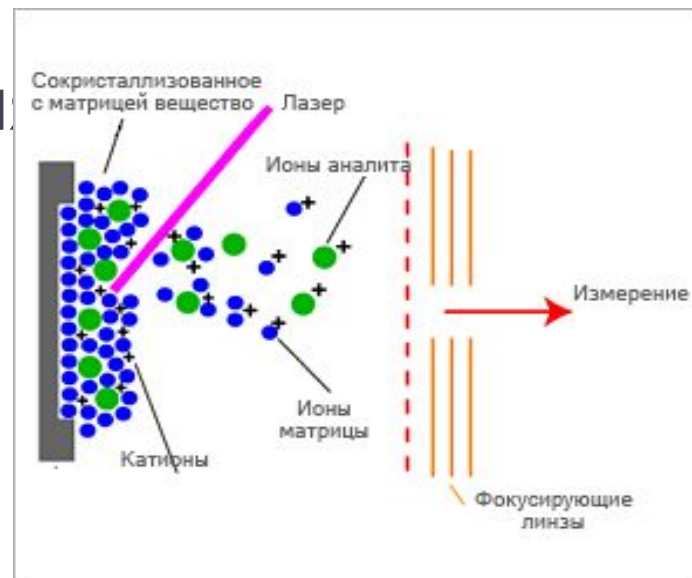




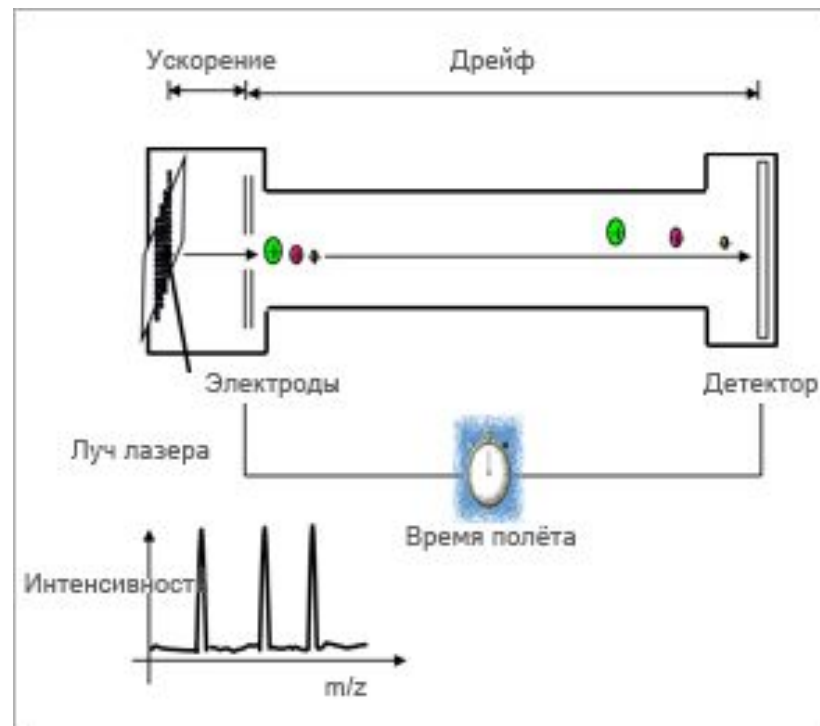
# Видовая идентификация.

## 6. MALDI-ToF масс-спектрометрии.

- **MALDI** (Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация) – способ ионизации вещества, использующийся при масс-спектрометрии. Относится к т.н. «мягким» способам ионизации, позволяющим ионизировать крупные биомолекулы без их деградации.
- В основе метода лежит использование вспомогательного вещества - «матрицы», свойства которого обуславливают понижение деструктивных свойств лазерного излучения и ионизацию анализируемого вещества.
- **TOF** (Time of Flight - вреямпролетный) – принцип устройства анализатора масс-спектрометра, в котором заряженные частицы разделяются по времени пролета определенного расстояния. При этом время пролета частицы пропорционально отношению массы данной частицы к ее заряду.



*MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация*



*Принцип работы MALDI TOF масс-спектрометра*

- **MALDI-ToF масс-спектрометрия** – метод времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией, позволяющий проводить видовую идентификацию по набору белков, входящих в состав микробной клетки.
- Расходным материалом для данного метода является насыщенный раствор вещества-матрицы (обычно используются производные коричной кислоты).
- На поверхности металлического или пластикового слайда чистая культура микроорганизмов смешивается с раствором матрицы, и при испарении растворителя образуется совместный кристалл из них.
- После этого слайд помещается в прибор, в котором поддерживается вакуум.
- Лазерный импульс испаряет кристаллы матрицы, в результате чего содержимое микробных клеток ионизируется и выбрасывается в рабочую область прибора.
- Ионизированные белки разгоняются электромагнитным полем и бьются об мишень, при этом по времени пролета до мишени определяется их массово-зарядовое соотношение.
- им образом, на выходе получается белковый спектр, позволяющий аппаратно-программному комплексу провести идентификацию чистой культуры.