

A row of six test tubes containing liquids of various colors: yellow, yellow, yellow, purple, yellow, and pink.

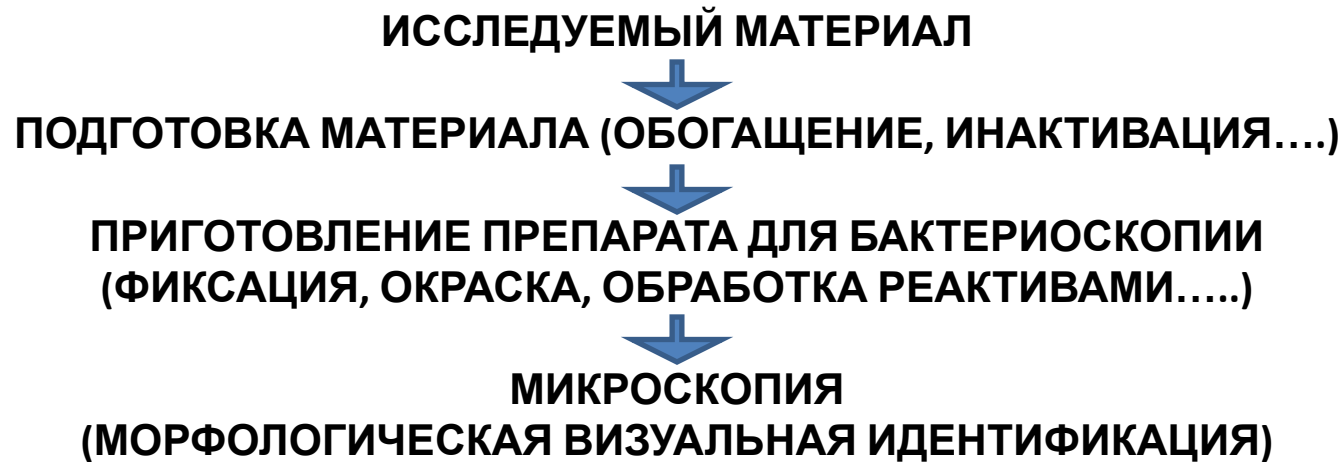
МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ В БАКТЕРИОЛОГИИ

Методы диагностики

- бактериоскопический метод
- бактериологический метод
- биологический метод
- иммунохимические реакции:
 - серологический метод
 - идентификация антигена
- аллергологический метод
- молекулярно-генетический метод
- масс-спектральный анализ

БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД

(ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ, ТИНКТОРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ)



Методы микроскопии

Оптическая: светопольная

темнопольная

фазово-контрастная

люминесцентная

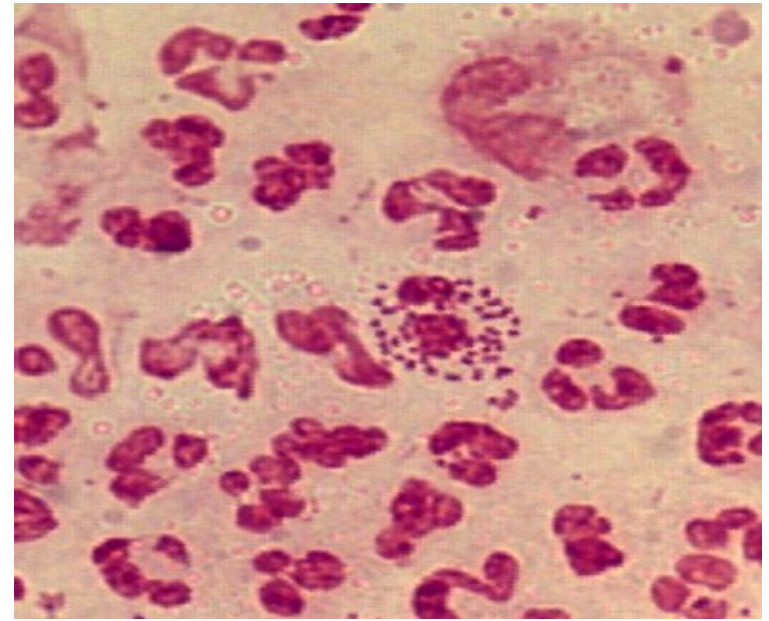
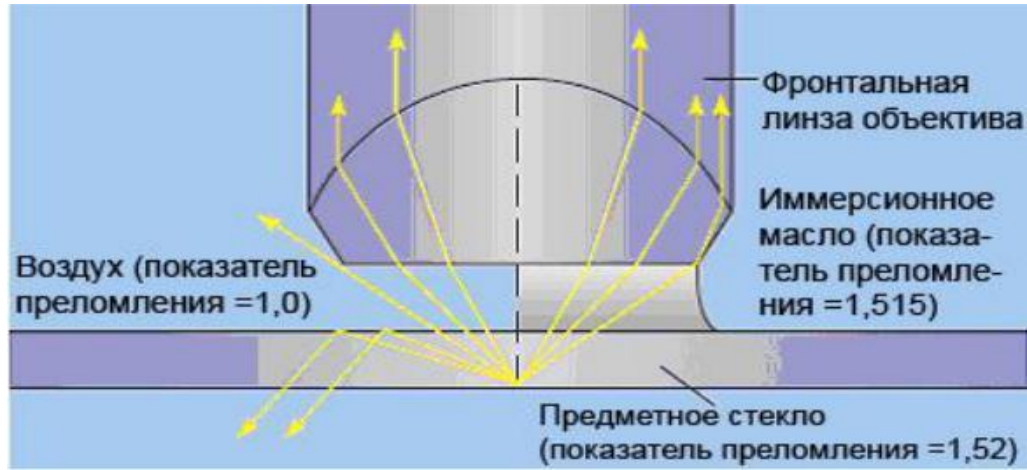
Электронная: трансмиссионная

сканирующая

Методы микроскопии

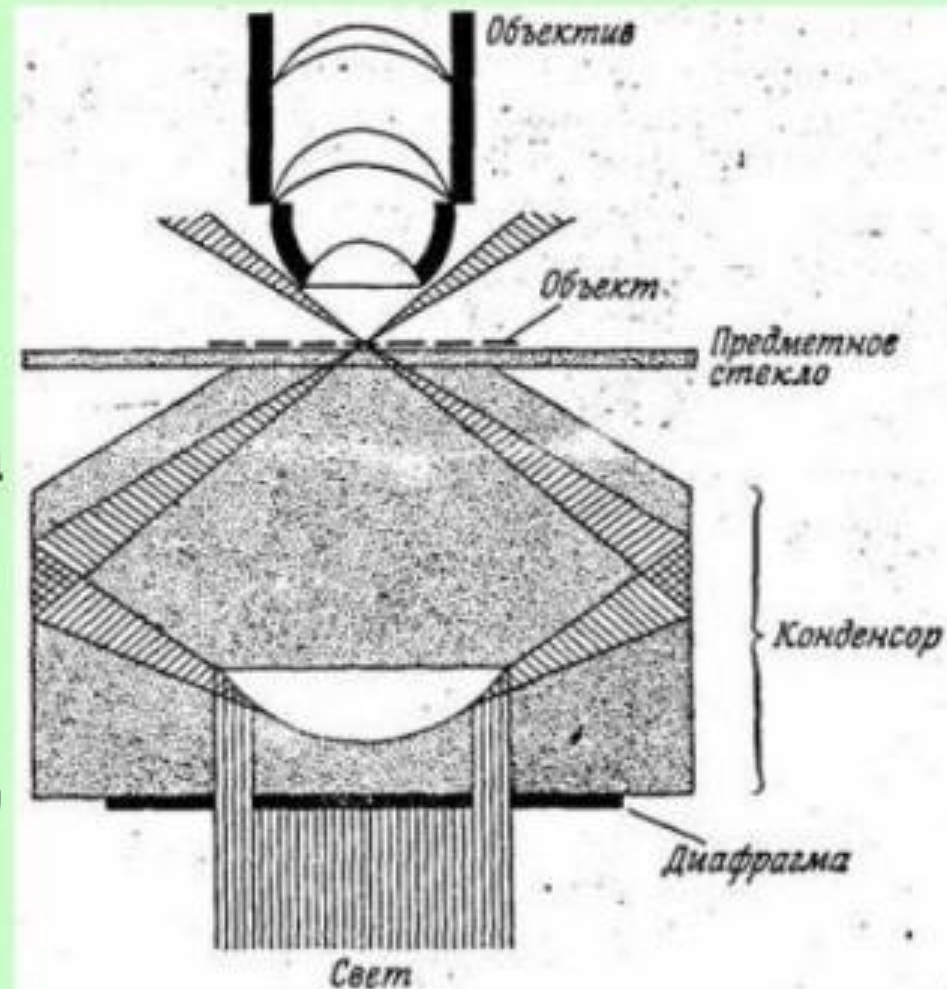
Вид микроскопии	Принцип	Разрешающая способность	Применение
Иммерсионная	Масляная система за счет выравнивания показателей преломления света повышает уровень полезного увеличения микроскопа	0,2 мкм	Изучение окрашенных объектов, размеры которых больше 0,2 мкм
Темнопольная	В основе лежит принцип рассеивания света мельчайшими взвешенными частицами в темном поле при боковом освещении (эффект Тиндалля)	0,2 мкм	Изучение неокрашенных подвижных микроорганизмов, видимых при боковом освещении на темном фоне
Фазово-контрастная	Используется система диафрагм для превращения не воспринимаемых человеческим глазом фазовых колебаний светового луча в амплитудные	0,2 мкм	Изучение неокрашенных микроорганизмов
Люминесцентная (флюоресцентная)	В основе лежит способность веществ и биологических объектов светиться при воздействии на них ультрафиолетовых лучей	0,2 мкм	Позволяет наблюдать объекты, обладающие естественной люминесценцией, и объекты, окрашенные флюоресцирующими красителями
Электронная	Вместо светового пучка используется поток электронов	0,1 - 0,2 нм	Применяется для изучения строения вирусов, тонкой организации различных структур микроорганизмов

Световая иммерсионная микроскопия окрашенных препаратов



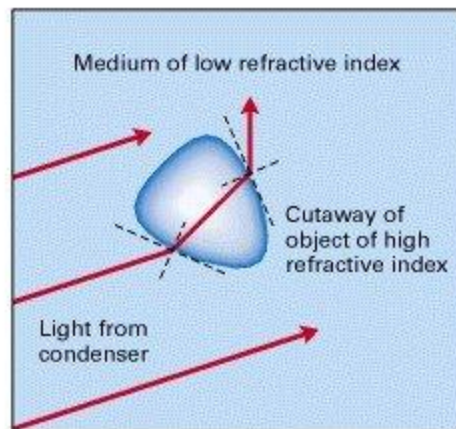
Темнопольная микроскопия

- Используется для изучения **ЖИВЫХ** бактерий в нативных препаратах "раздавленная" или "висячая капля".
- Микроскопия в темном поле зрения основана на том, что лучи освещают объект не снизу, а сбоку и не попадают в глаза наблюдателя, поле зрения остается темным, а объект выглядит светящимся. Это достигается с помощью специального **параболоид-конденсора**.

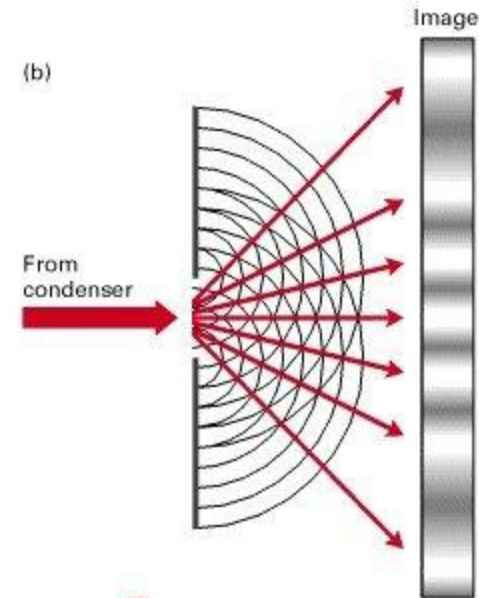


Фазово-контрастная микроскопия и микроскопия на основе дифференциально интерференционного контраста

(a)



(b)

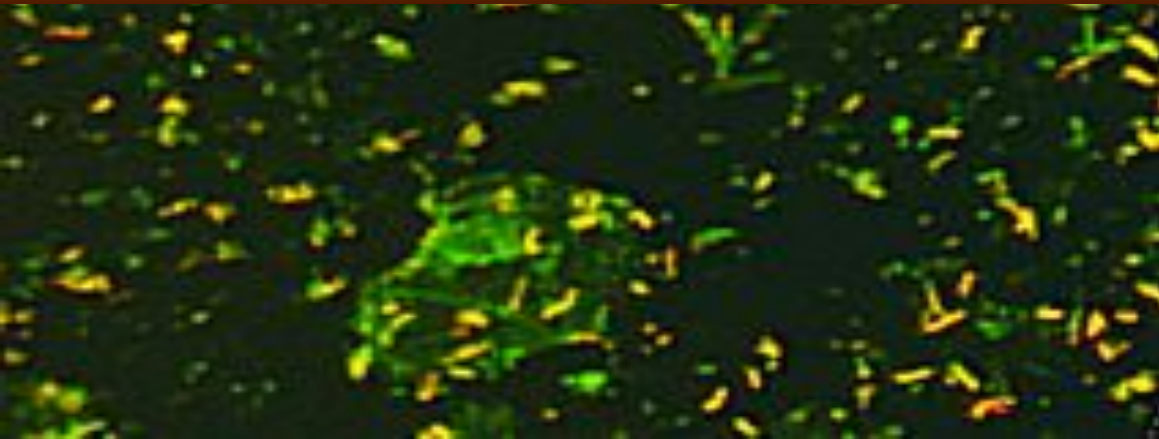


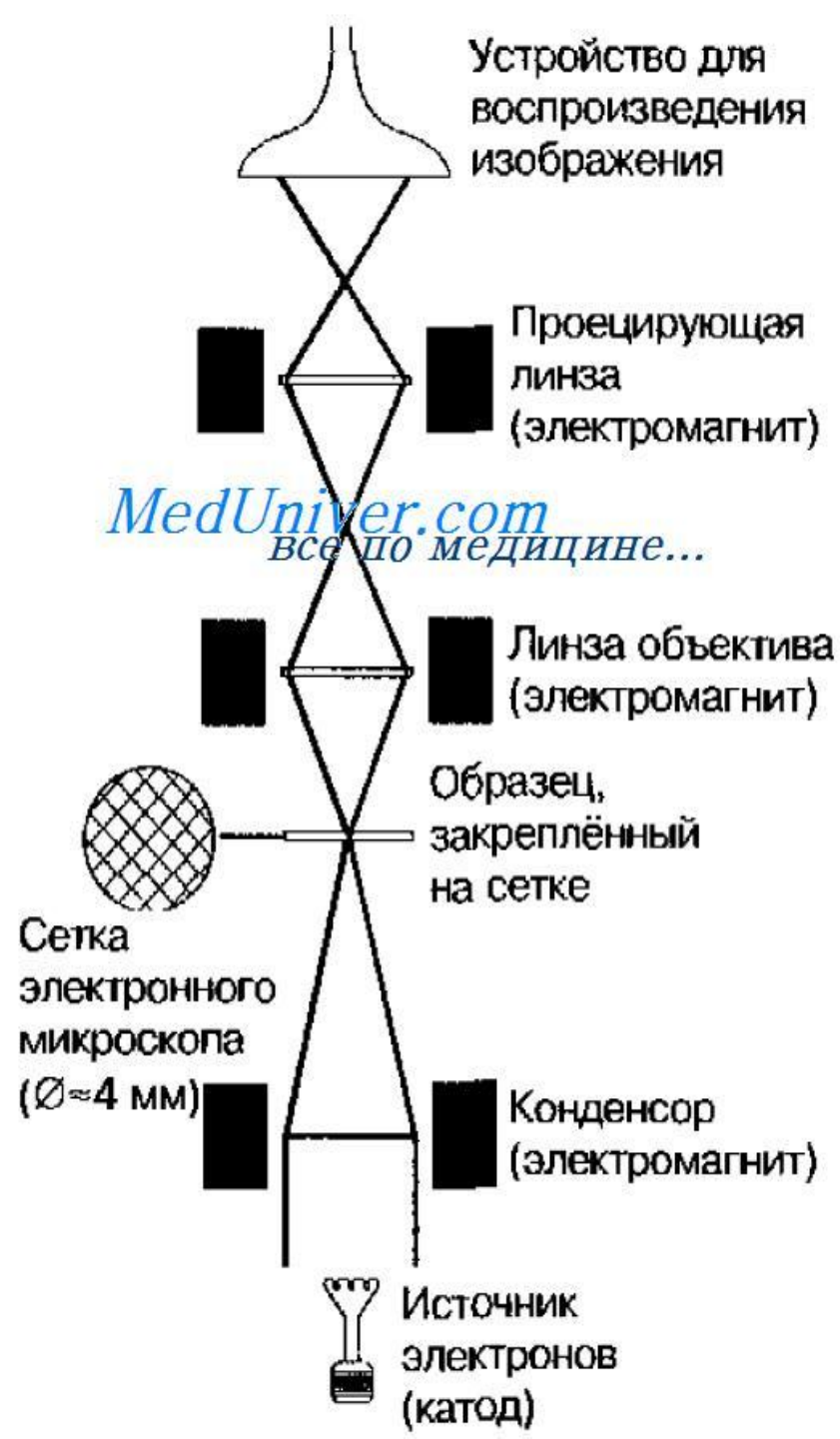
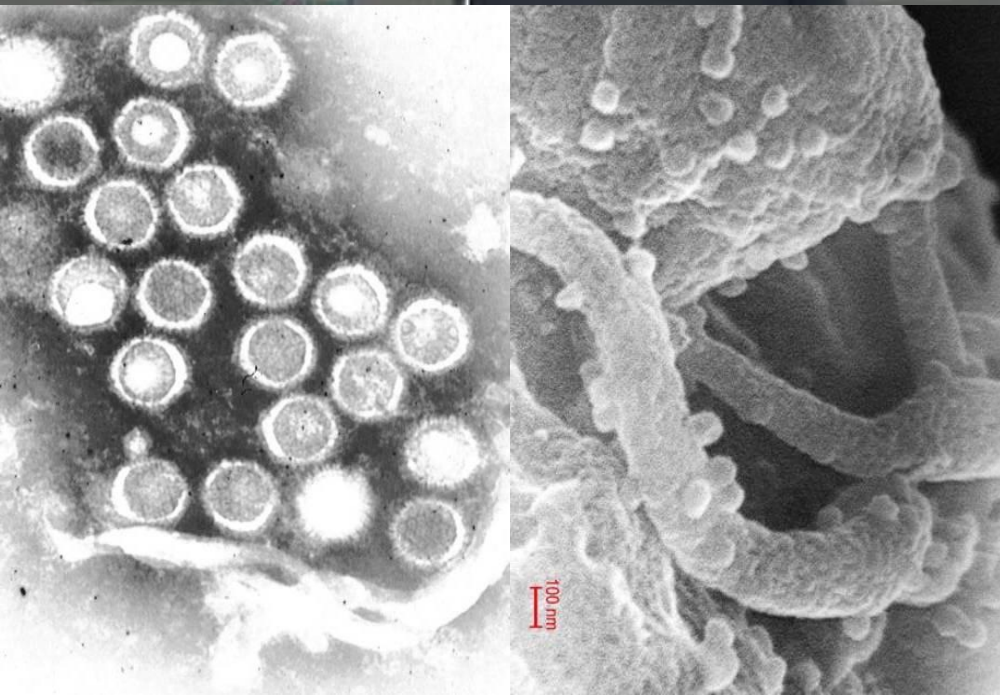
- Свет проходящий через образец может быть перенаправлен рефракцией и дифракцией (a) Рефракция: так как свет двигается с различной скоростью в различных материалах (более медленно в среде с высоким индексом рефракции. (b) Дифракция.

Люминесцентная микроскопия



- В основе люминесцентной микроскопии лежит явление люминесценции, т. е. способности нек-рых веществ светиться при облучении их коротковолновой (сине-фиолетовой) частью видимого света либо ультрафиолетовыми лучами с длиной волны, близкой к видимому свету. Люминесцентная микроскопия используется в диагностических целях для наблюдения живых или фиксированных микроорганизмов, окрашенных люминесцирующими красителями (флюорохромами) в очень больших разведениях, а также при выявлении различных антигенов и антител с помощью иммунофлюоресцентного метода





БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

(ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ)

ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ



**ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА И ПОСЕВ С ЦЕЛЬЮ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ
КУЛЬТУРЫ**



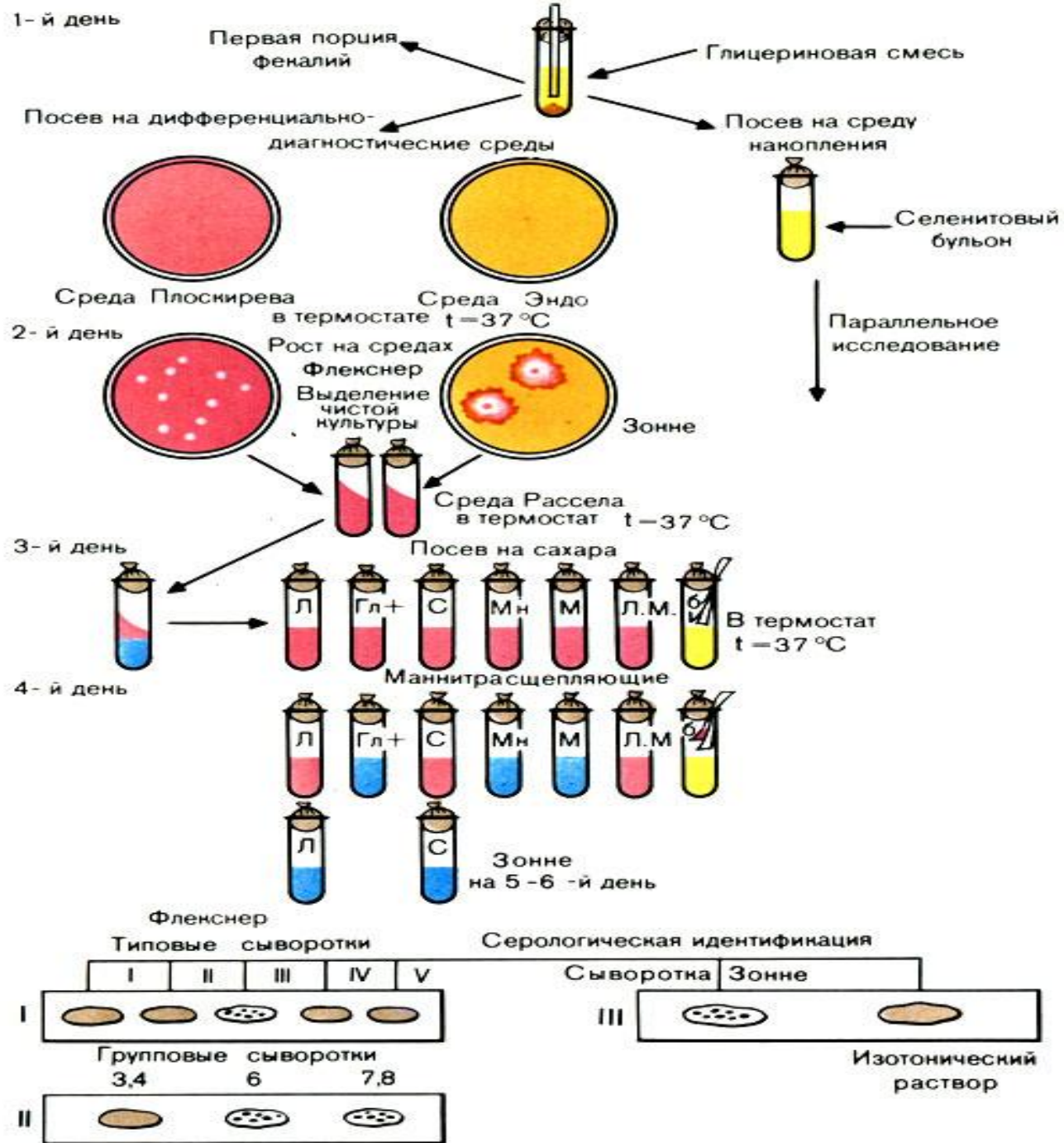
НАКОПЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ



**ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ, БИОХИМИЧЕСКИХ, БИОЛОГИЧЕСКИХ,
АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ**



**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДА (ПОДВИДА, ТИПА)
В СООТВЕТСТВИИ С ОПРЕДЕЛИТЕЛЕМ БЕРДЖИ**



БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

(МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНФЕКЦИИ НА ЖИВОТНОМ)

ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ



ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА
(ОБОГАЩЕНИЕ, ИНАКТИВАЦИЯ СОПУТСТВУЮЩЕЙ ФЛОРЫ...)



ВЫБОР ЖИВОТНОГО И СПОСОБА ВВЕДЕНИЯ



ДИНАМИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ ЗА ЖИВОТНЫМ



ЗАБОР МАТЕРИАЛА ОТ ЖИВОТНОГО



ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ



ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ **СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД**

(ОПРЕДЕЛЕНИЕ Ig M – Ig G)

ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ - СЫВОРОТКА



ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА

**(ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ, ОТСТАИВАНИЕ, ИНАКТИВАЦИЯ, ПРИГОТОВЛЕНИЕ
РАЗВЕДЕНИЙ...)**



ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ

УЧЕТ

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ

РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

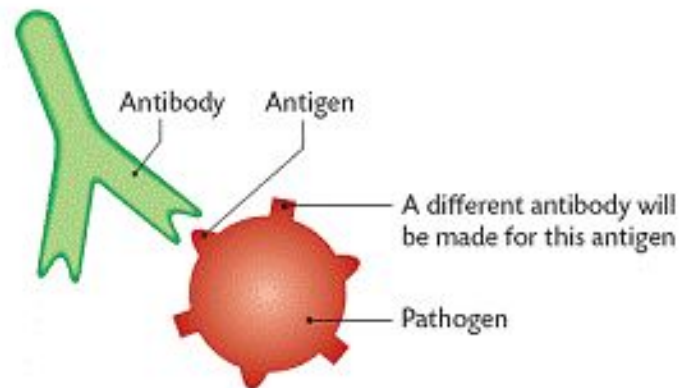
ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

ИММУНОБЛОТИНГ

РЕАКЦИЯ МИКРОПРЕЦИПИТАЦИИ

РЕАКЦИЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БЛЕДНЫХ ТРЕПОНЕМ

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ И ЛИЗИСА ЛЕПТОСПИР И ДР.



ИДЕНТИФИКАЦИЯ АНТИГЕНА

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ

РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

РЕАКЦИЯ КОАГГЛЮТИНАЦИИ

РЕАКЦИЯ ЛАТЕКСАГГЛЮТИНАЦИИ

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ

РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ТОКСИНА АНТИТОКСИНОМ

РЕАКЦИЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ВИБРИОНОВ

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ДР.

АЛЛЕРГОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

(ВЫЯВЛЕНИЕ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ ОРГАНИЗМА КОЖНОЙ ПРОБОЙ ГЗТ)

ВНУТРИКОЖНОЕ ВВЕДЕНИЕ АЛЛЕРГЕНА



РЕГИСТРАЦИЯ РАЗМЕРА ПАПУЛЫ (ГИПЕРЕМИИ) ЧЕРЕЗ 24-72 ЧАСА

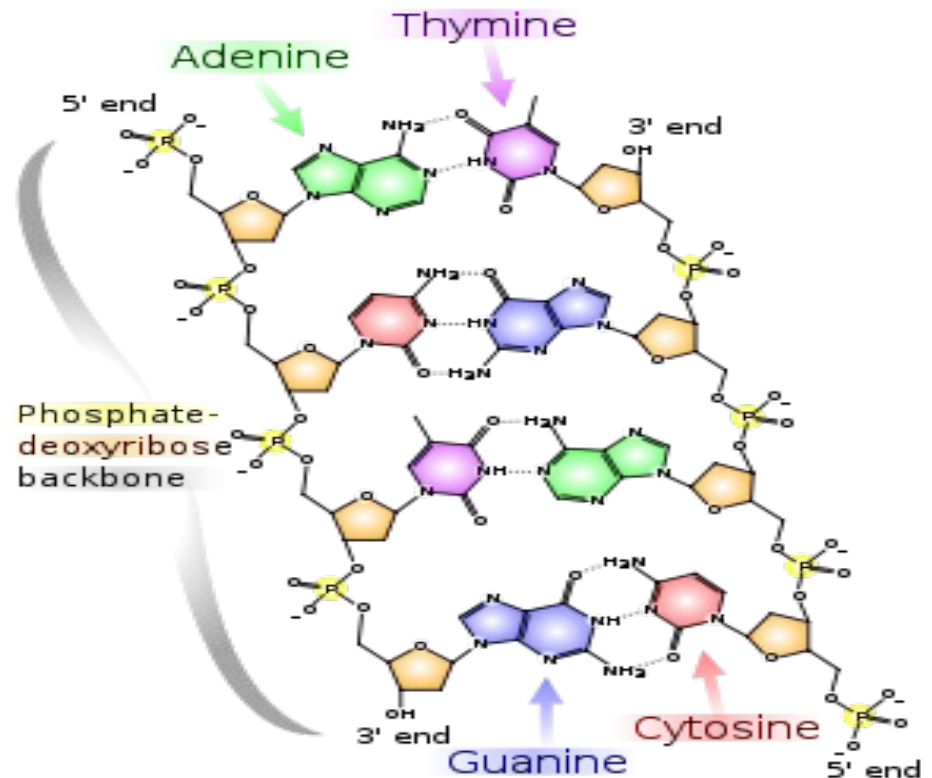


МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД

РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

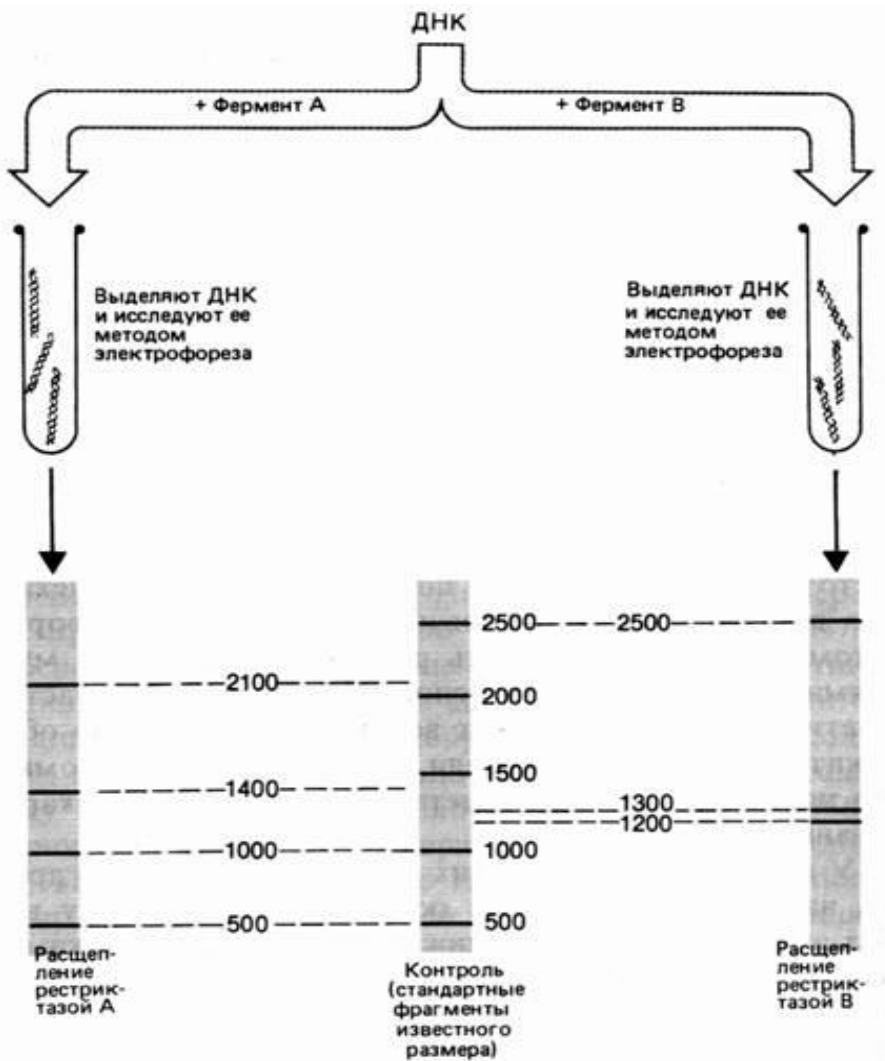
ГИБРИДИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

ПЦР И ДР.



РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

Рестриктазы -- расщепляют молекулы ДНК в определенных последовательностях нуклеотидов. В геноме есть строго определенное число участков узнавания для конкретной рестриктазы. Обработка ДНК микроба рестриктазой ведет к образованию определенного количества фрагментов фиксированного размера. Размер фрагмента определяется в электрофорезе, создается рестрикционная карта вида микроба.



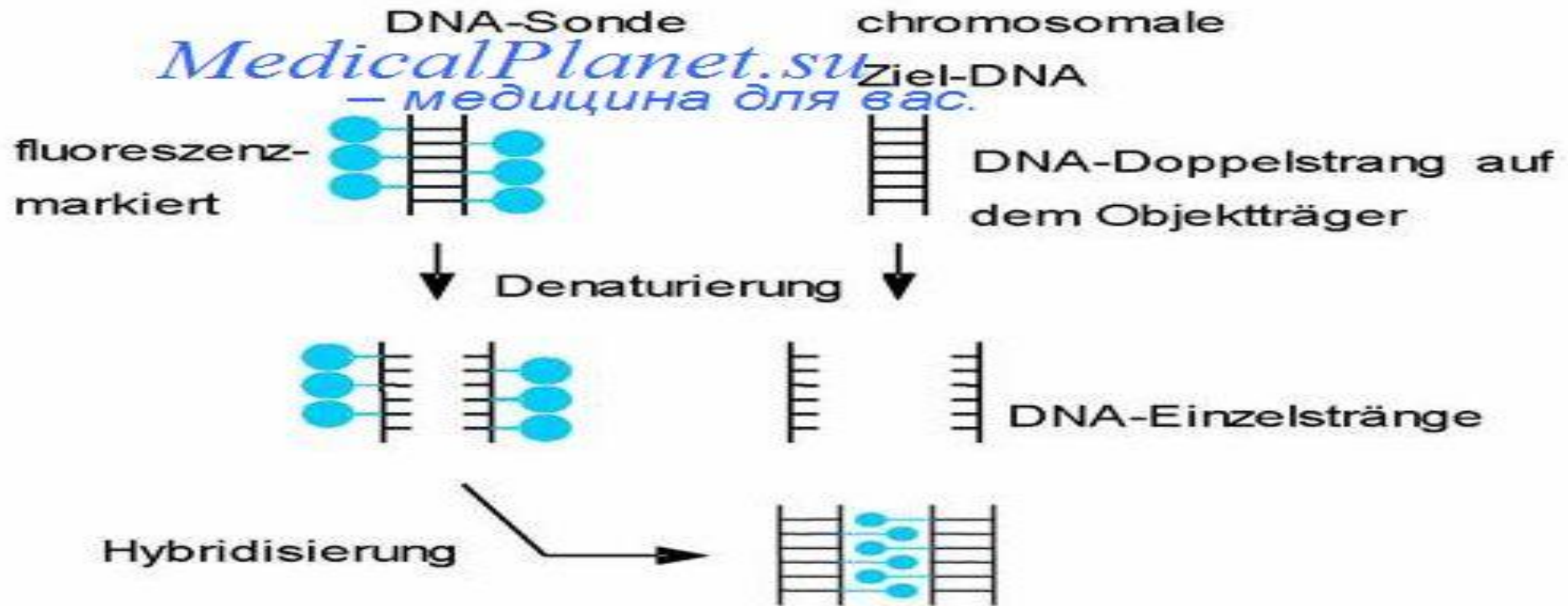
Результаты электрофореза после обработки фрагмента ДНК разными рестриктазами

Анализ фрагментов рестрикции и карта фрагмента ДНК



Гибридизация нуклеиновых кислот — соединение *in vitro* комплементарных одноцепочечных нуклеиновых кислот в одну молекулу. Возможна гибридизация ДНК-ДНК и ДНК-РНК. Метод требует наличие «зонда» – последовательности определенных олигонуклеотидов, комплементарных высококонсервативным и высокоспецифичным для искомого генома. Зонд содержит метку.

- Двухцепочечную ДНК разогревают - цепочки расходятся.
- Препарат денатурированной ДНК смешивается с зондом.
- Смесь медленно охлаждается - одноцепочечные ДНК отжигаются друг на друга, образуется «гибридная» молекула.



Mixed population



Fixation



Hybridization



Probe

Fluorescent dye

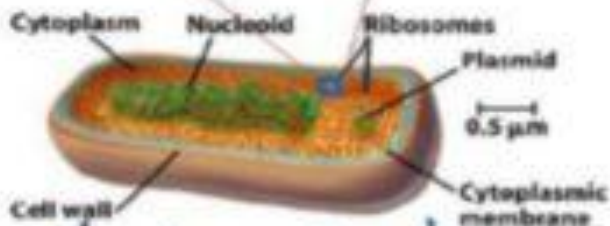


Target (16S rRNA)



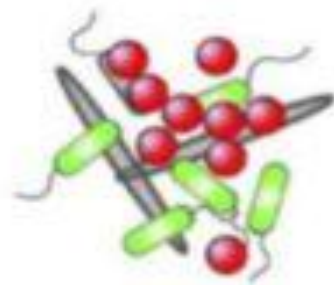
30S subunit
containing
16S rRNA

Ribosome



Fluorescent oligonucleotide probes

Washing



Hybridized cells

FISH analysis



Fluorescence
microscopy



Flow cytometry



МАСС-СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

**(ПЕРЕВОД МОЛЕКУЛ ИССЛЕДУЕМОГО ОБРАЗЦА В ИОНИЗИРОВАННУЮ
ФОРМУ С ПОСЛЕДУЮЩИМ РАЗДЕЛЕНИЕМ И РЕГИСТРАЦИЕЙ
ОБРАЗУЮЩИХСЯ ИОНОВ С ОДНОВРЕМЕННЫМ ИЗМЕРЕНИЕМ МАССЫ
КАЖДОГО ИЗ НИХ)**

**ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ
(КОЛОНИЯ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЖИДКОСТЬ....)**



ВНЕСЕНИЕ В ЯЧЕЙКУ



ПОМЕЩЕНИЕ В МАСС-СПЕКТРОМЕТР



ПОЛУЧЕНИЕ СПЕКТРА И СРАВНЕНИЕ ЕГО С «БИБЛИОТЕКОЙ»



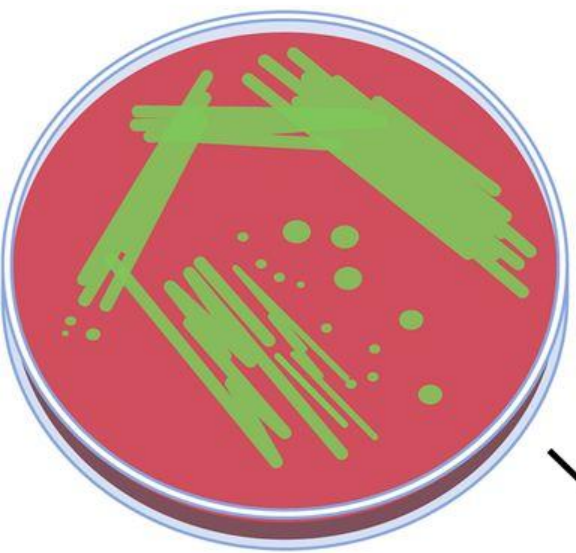
РЕЗУЛЬТАТ

КАЖДОЕ СОЕДИНЕНИЕ ОБЛАДАЕТ ИНДИВИДУАЛЬНЫМ НАБОРОМ АТОМОВ И ИХ УНИКАЛЬНЫМ РАСПОЛОЖЕНИЕМ В СТРУКТУРЕ ВЕЩЕСТВА, ЧТО ОБУСЛОВЛИВАЕТ НАЛИЧИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП

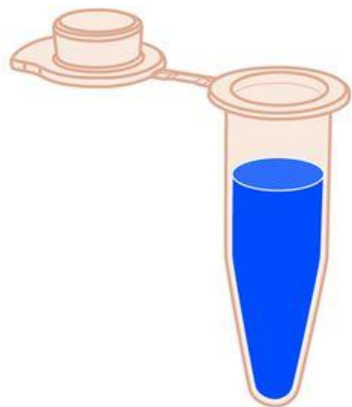
КАЖДАЯ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГРУППА ОБЛАДАЕТ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ МАССОЙ.

**В СУММЕ МАССА ВСЕХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП ДАСТ МАССУ ИСХОДНОГО СОЕДИНЕНИЯ
МАССА ОТДЕЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ ОБЪЕКТА – ОСНОВНОЙ
МАРКЕР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЕГО ИСХОДНОЙ СТРУКТУРЫ**

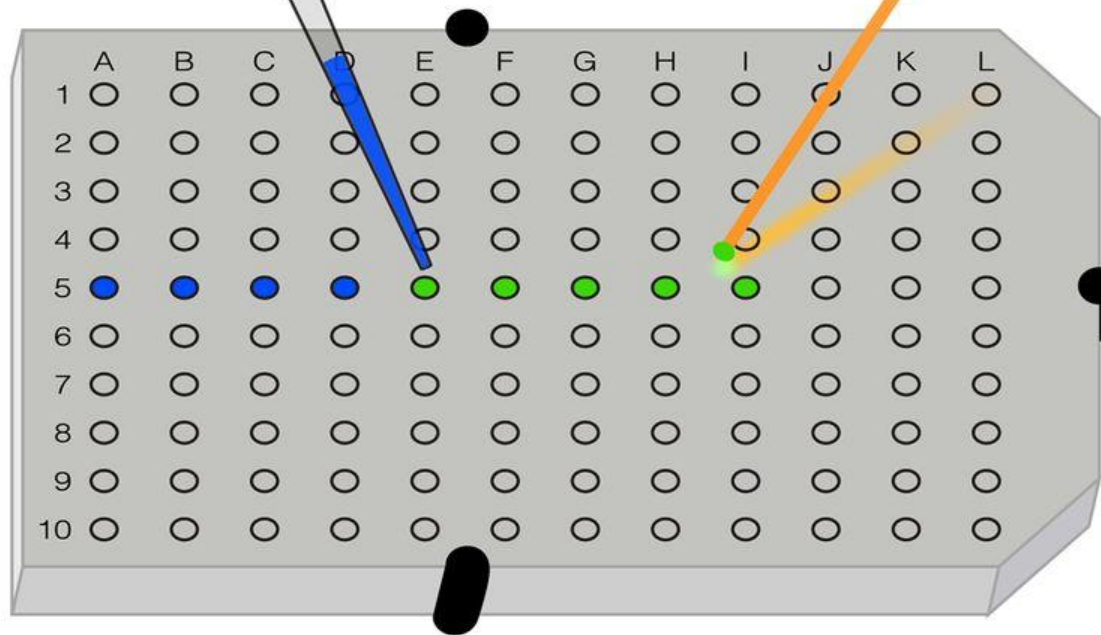
МАСС-СПЕКТР – ЕСТЬ ГРАФИЧЕСКОЕ ОТРАЖЕНИЕ ЭТИХ МАСС



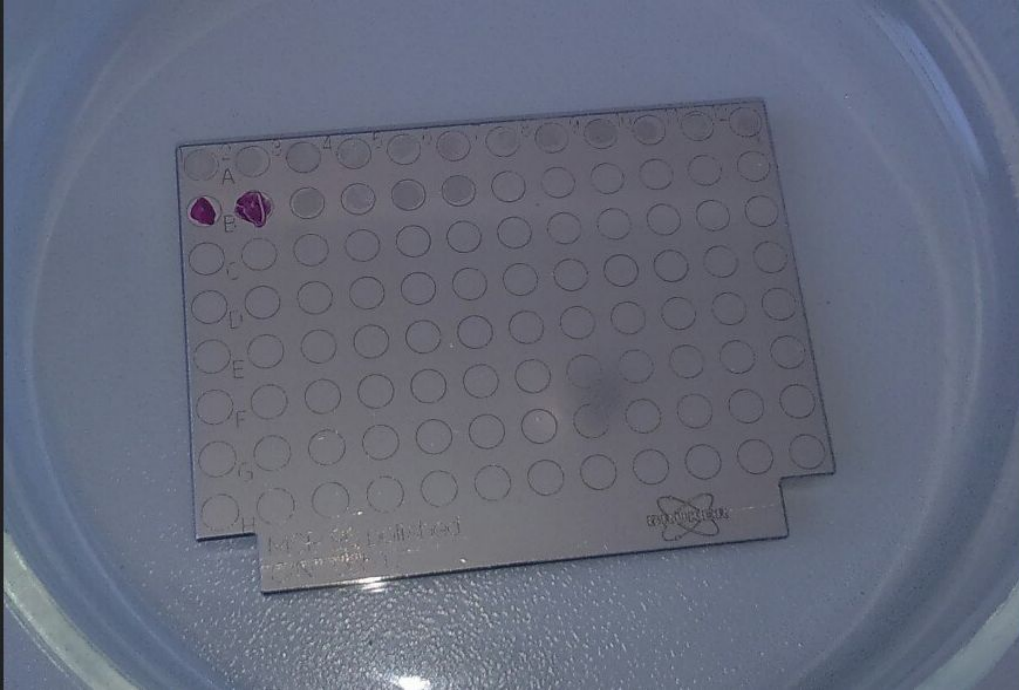
① Sample culture

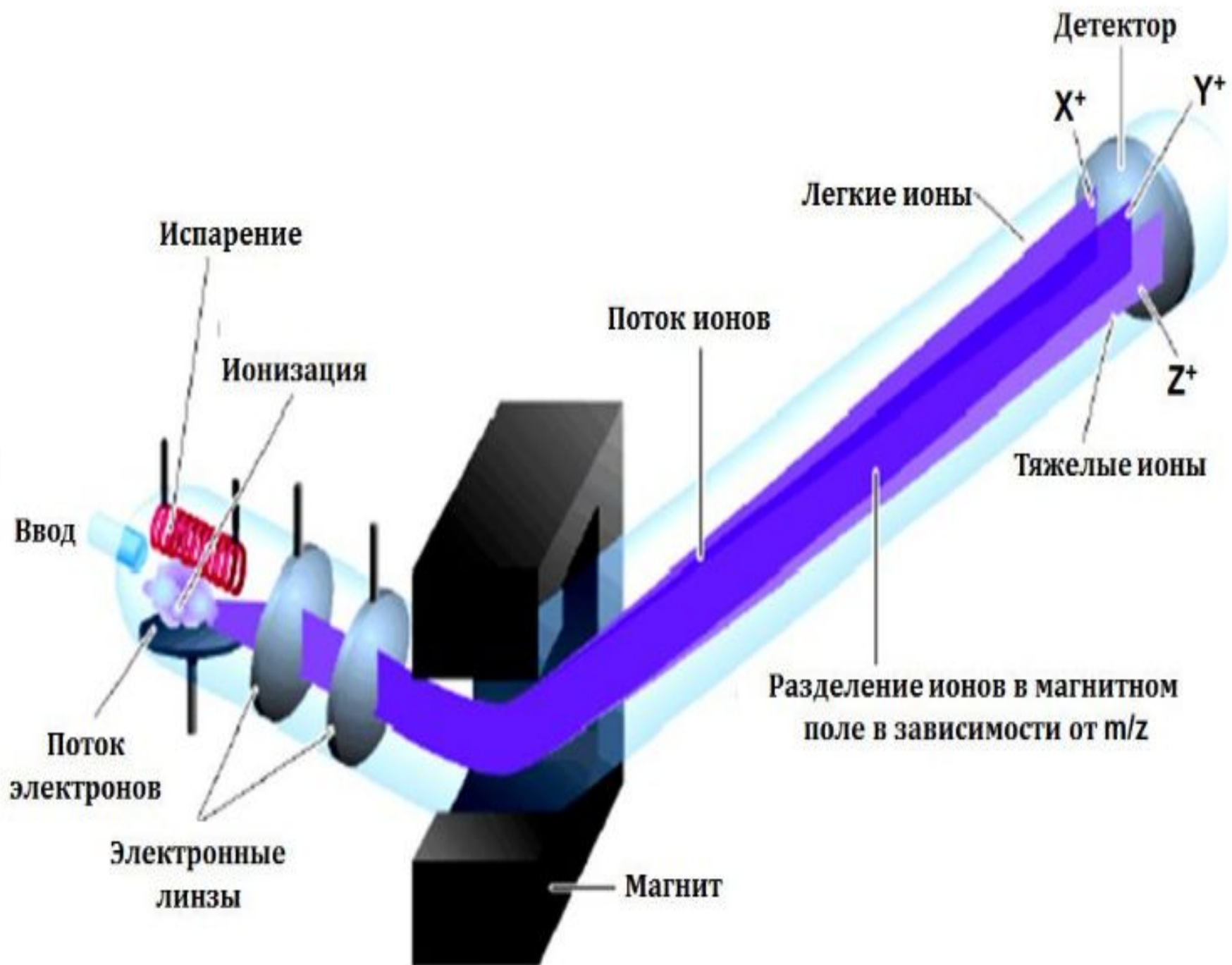


② Matrix



③ MALDI-TOF/MS
sample plate





MALDI Biotyper



Broad applicability of MALDI-TOF profiling

gram+ and gram- bacteria, yeasts, filamentous fungi

