МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ В БАКТЕРИОЛОГИИ

Методы диагностики

- бактериоскопический метод
- бактериологический метод
- биологический метод
- <u>иммунохимические реакции</u>:

серологический метод

идентификация антигена

- аллергологический метод
- молекулярно-генетический метод
- масс-спектральный анализ

БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД

(ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ , ТИНКТОРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ)

ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

↓

ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА (ОБОГАЩЕНИЕ, ИНАКТИВАЦИЯ….)

↓

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА ДЛЯ БАКТЕРИОСКОПИИ (ФИКСАЦИЯ, ОКРАСКА, ОБРАБОТКА РЕАКТИВАМИ…..)

↓

МИКРОСКОПИЯ (МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ВИЗУАЛЬНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ)

Методы микроскопии

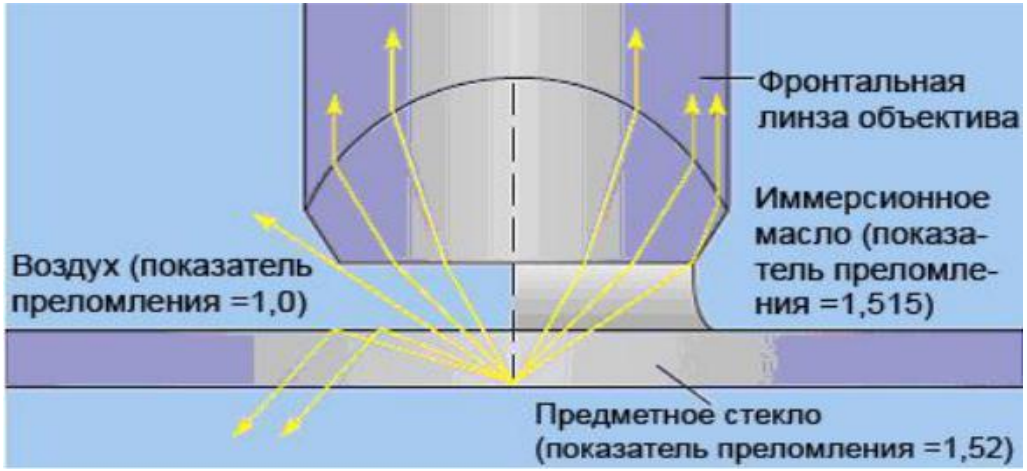
Оптическая: **светопольная**
темнопольная
фазово-контрастная
люминесцентная

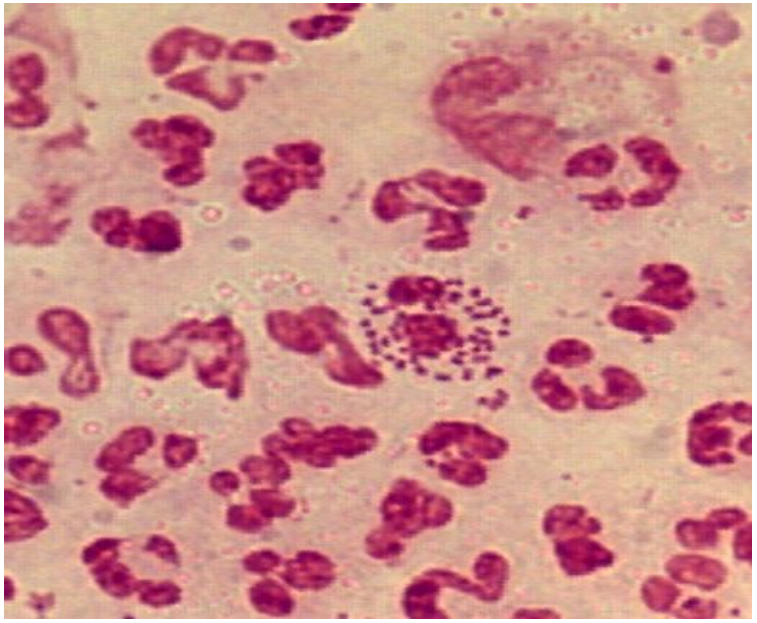
Электронная: **трансмиссионная**
сканирующая

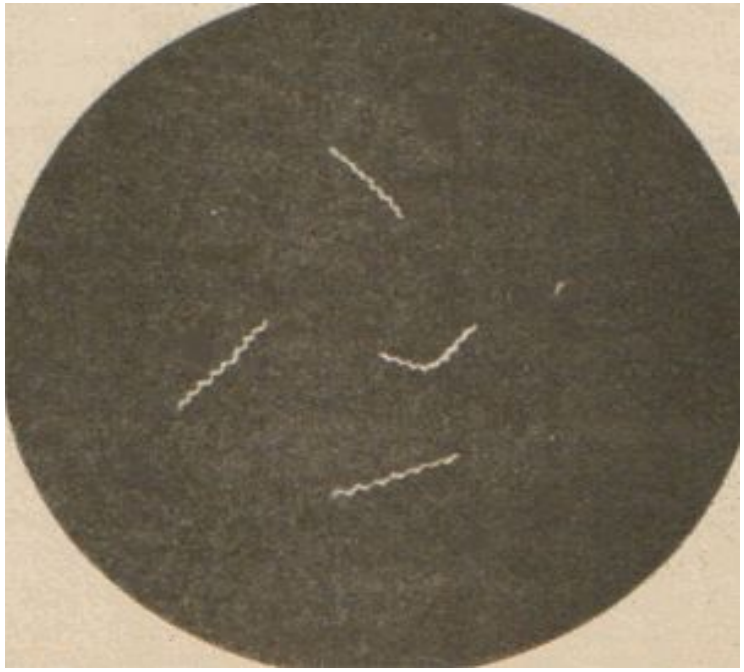
Методы микроскопии

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 Тиндаля)	**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

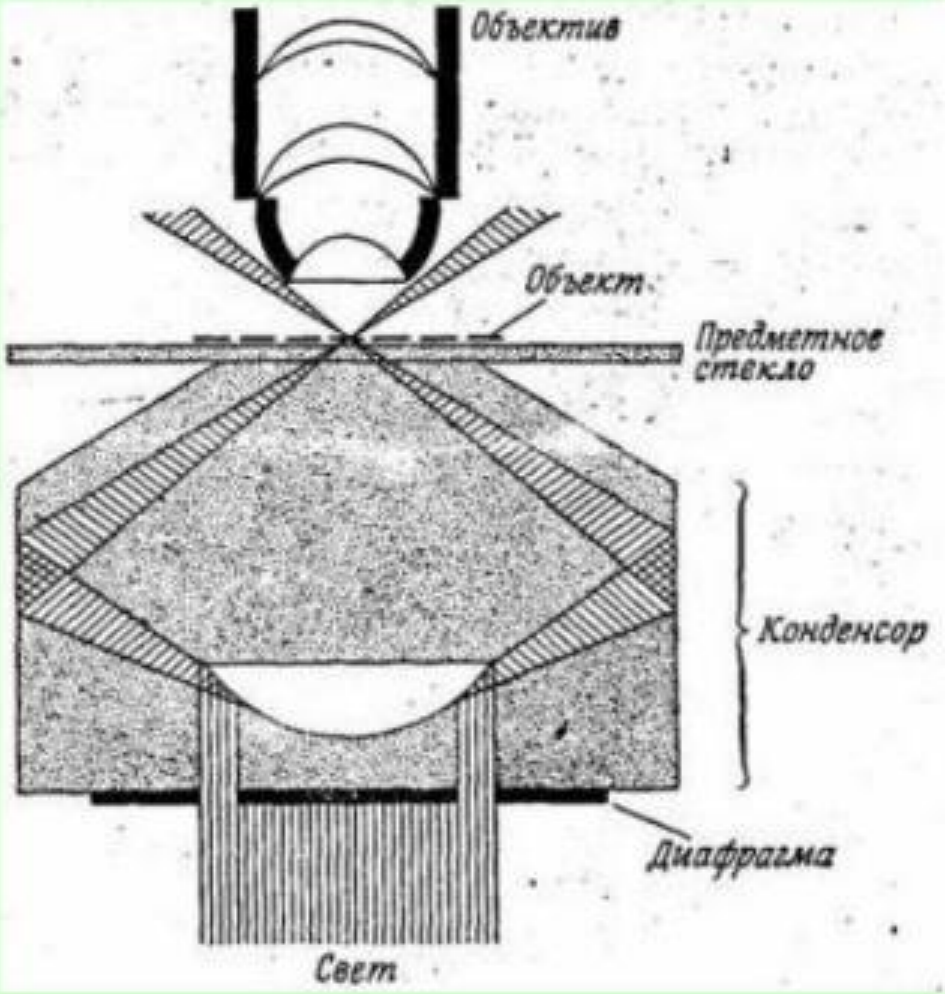






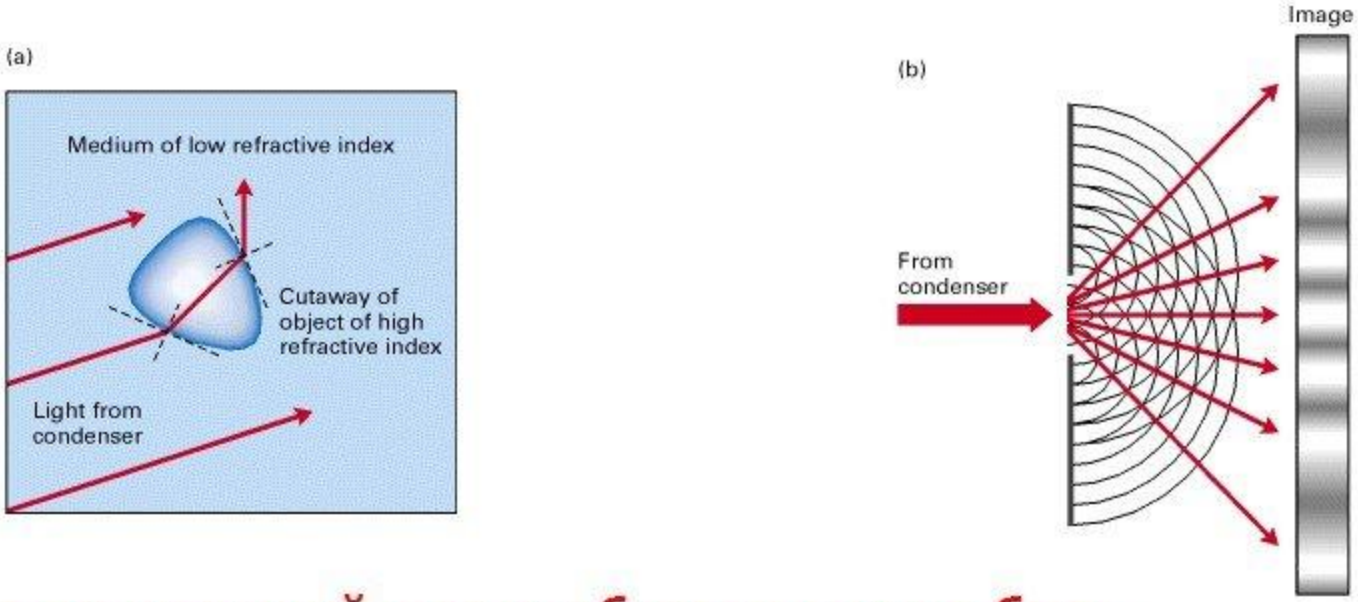
Темнопольная микроскопия

- 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**.



PPt4WEB.ru

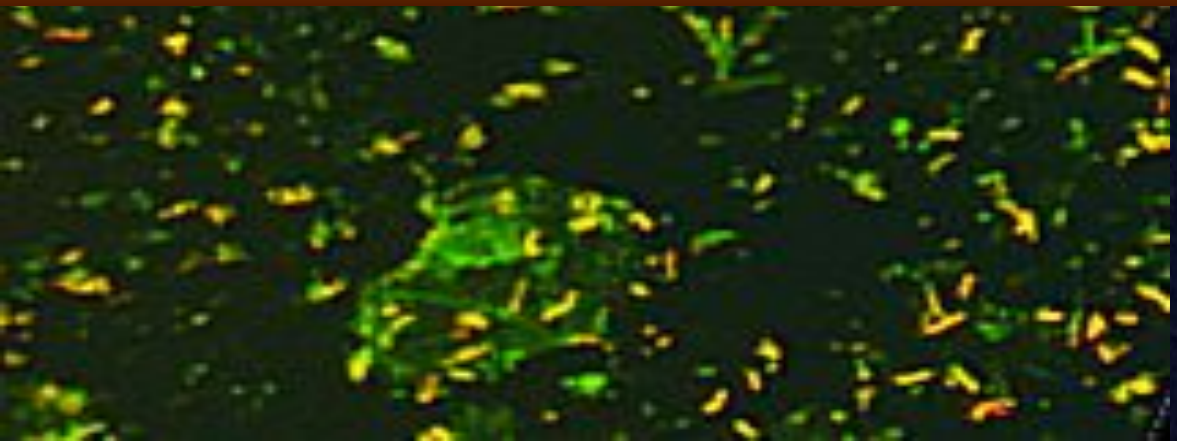
Фазово-контрастная микроскопия и микроскопия на основе дифференциально интерференционного контраста

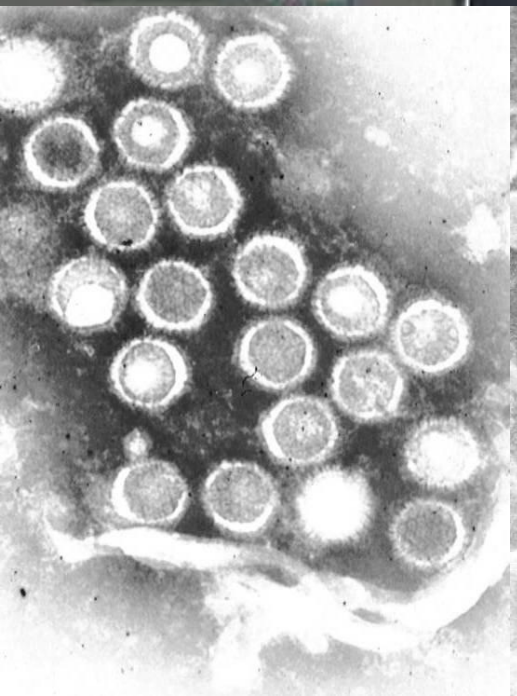


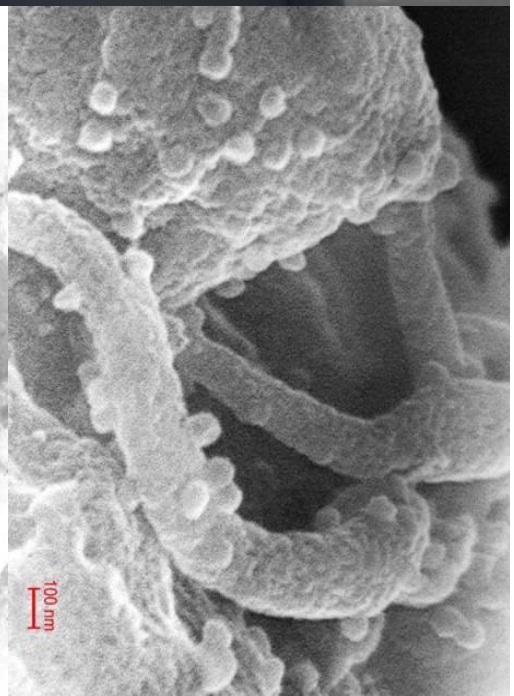
- Свет проходящий через образец может быть перенаправлен рефракцией и дифракцией (a) Рефракция: так как свет двигается с различной скоростью в различных материалах (более медленно в среде с высоким индексом рефракции. (b) Дифракция.

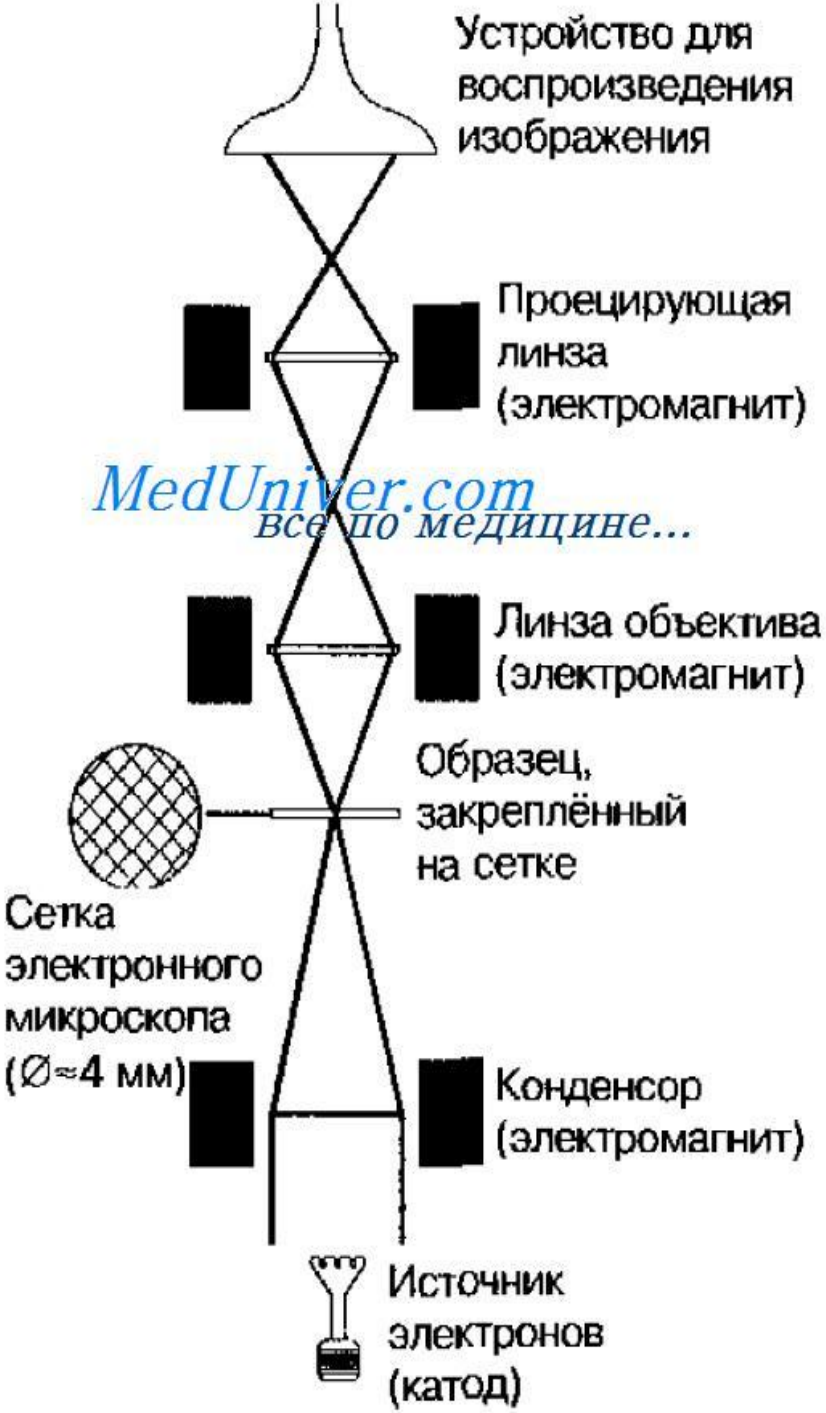
Люминесцентная микроскопия

- 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









MedUniver.com
все по медицине...

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

(ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ)

ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

↓

ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА И ПОСЕВ С ЦЕЛЬЮ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

↓

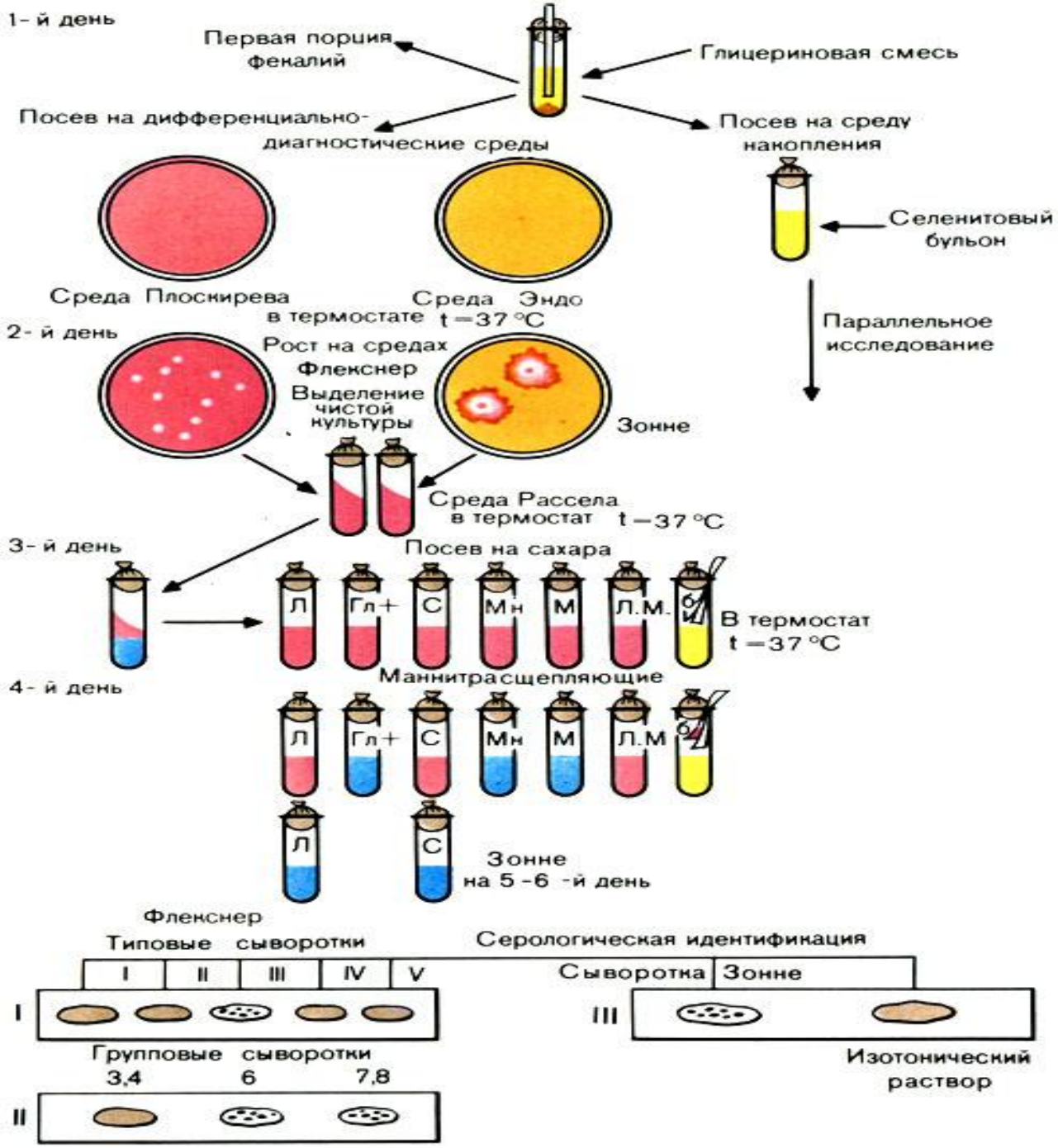
НАКОПЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

↓

ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ, БИОХИМИЧЕСКИХ, БИОЛОГИЧЕСКИХ, АНТИГЕННЫХ СВОЙСТ В

↓

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


1- й день
Первая порция фекалий
Глицериновая смесь
Посев на дифференциально-диагностические среды
Посев на среду накопления
Селенитовый бульон
Среда Плоскирева
Среда Эндо
в термостате t=37 °С
Параллельное исследование
2- й день
Рост на средах
Флекснер
Выделение чистой культуры
Зонне
Среда Рассела
в термостат t=37 °С
3- й день
Посев на сахара
Л
Гл+
С
Мн
М
Л.М.
В термостат
t=37 °С
Маннитрасщепляющие
4- й день
Л
Гл+
С
Мн
М
Л.М
Л
С
Зонне
на 5-6 -й день
Флекснер
Типовые сыворотки
I
II
III
IV
V
Серологическая идентификация
Сыворотка
Зонне
I
III
Групповые сыворотки
3,4
6
7,8
II
Изотонический раствор

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

(МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНФЕКЦИИ НА ЖИВОТНОМ)

ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

↓

ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА
(ОБОГАЩЕНИЕ, ИНАКТИВАЦИЯ СОПУТСТВУЮЩЕ Й 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)

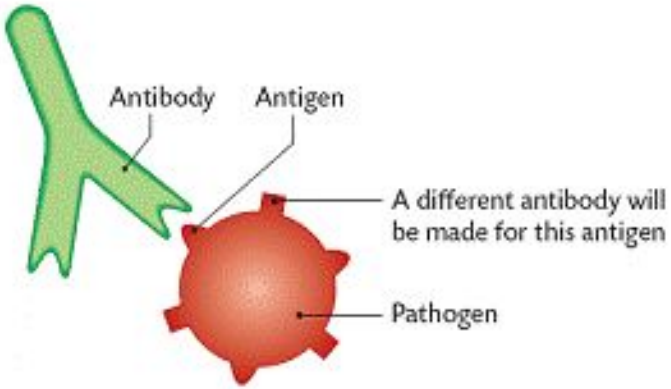
ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ - СЫВОРОТКА

ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА

(ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ, ОТСТАИВАНИЕ, ИНАКТИВАЦИЯ, ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАЗВЕДЕНИЙ…)

ПОСТАНОВКА РЕАКЦ

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.

ИДЕНТИФИКЦИЯ 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

↓

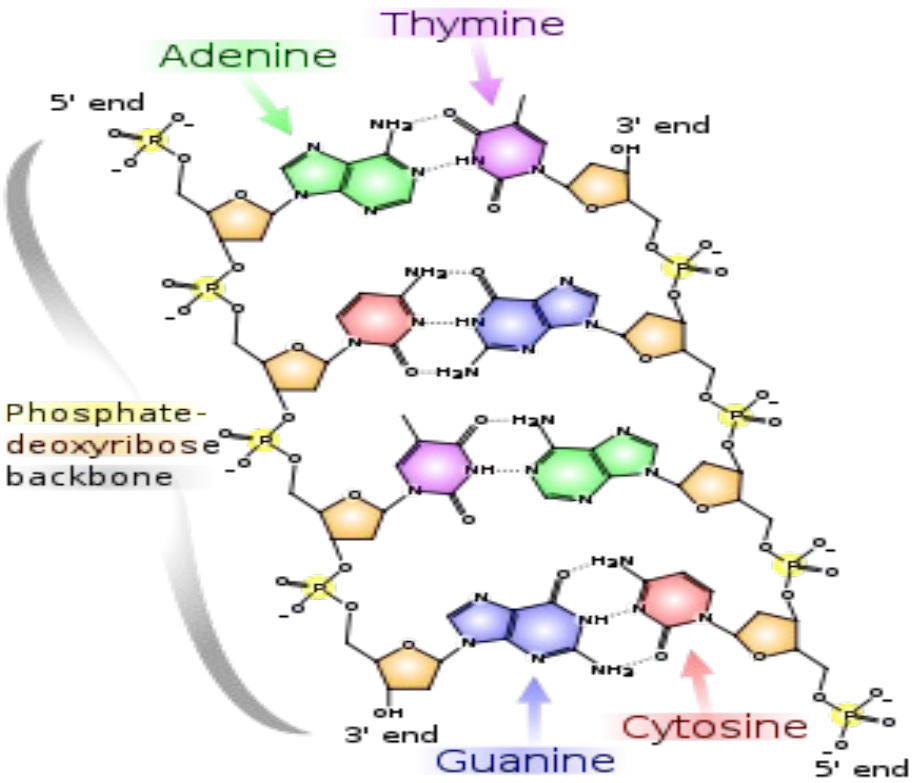
РЕГИСТРАЦИЯ РАЗМЕРА ПАПУЛЫ (ГИПЕРЕМИИ) ЧЕРЕЗ 24-72 ЧАСА

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД

РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

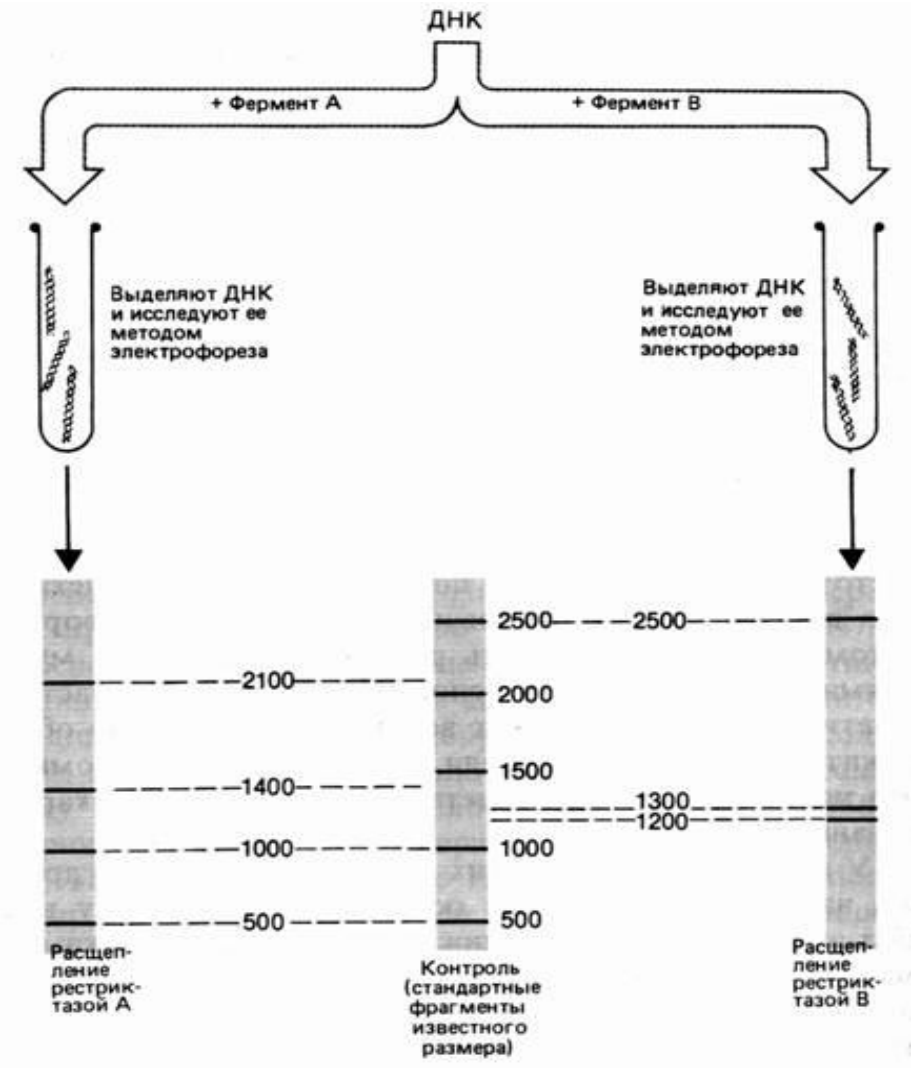
ГИБРИДИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

ПЦР И ДР.



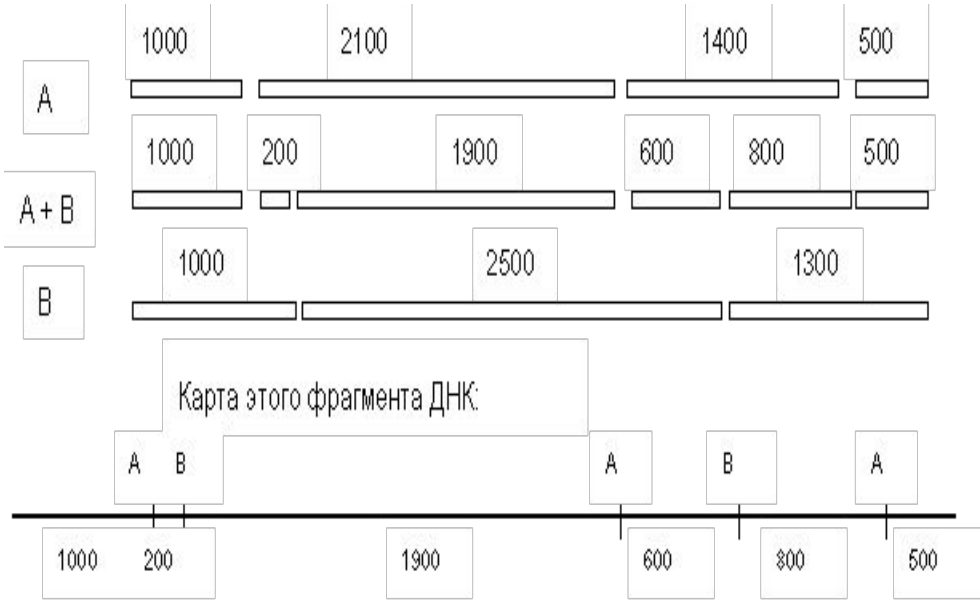
РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

<u>Рестриктазы</u> -- 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.



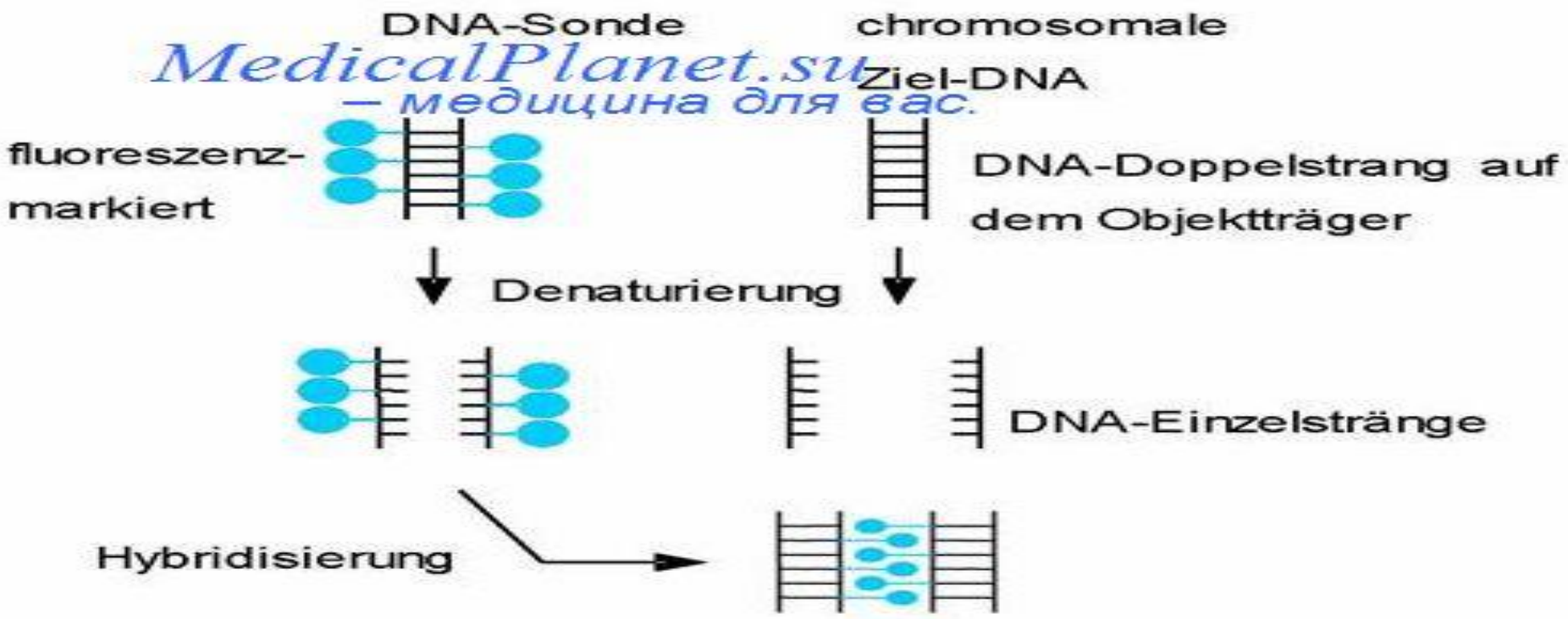
Результаты электрофореза после обработки фрагмента ДНК разными рестриктазами

Анализ фрагментов рестрикции и карта фрагмента ДНК



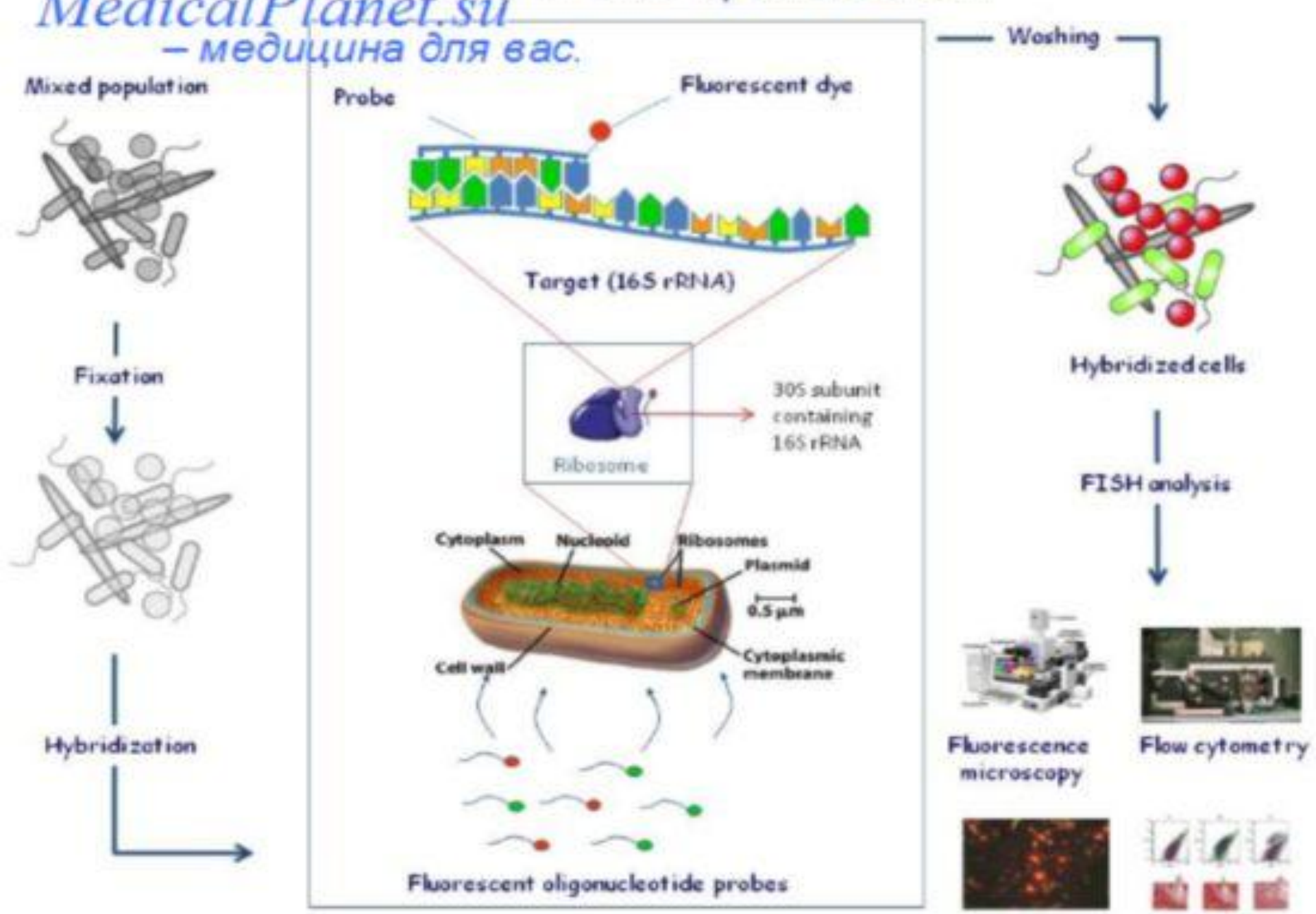
Гибридизация нуклеиновых кислот — соединение *in vitro* комплементарных одноцепочечных нуклеиновых кислот в одну молекулу. Возможна гибридизация ДНК-ДНК и ДНК-РНК. Метод требует наличие «зонда» – последовательности определенных олигонуклеотидов, комплементарных высококонсервативным и высокоспецифичным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

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



MedicalPlanet.su
— медицина для вас.

MedicalPlanet.su
– медицина для вас.



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

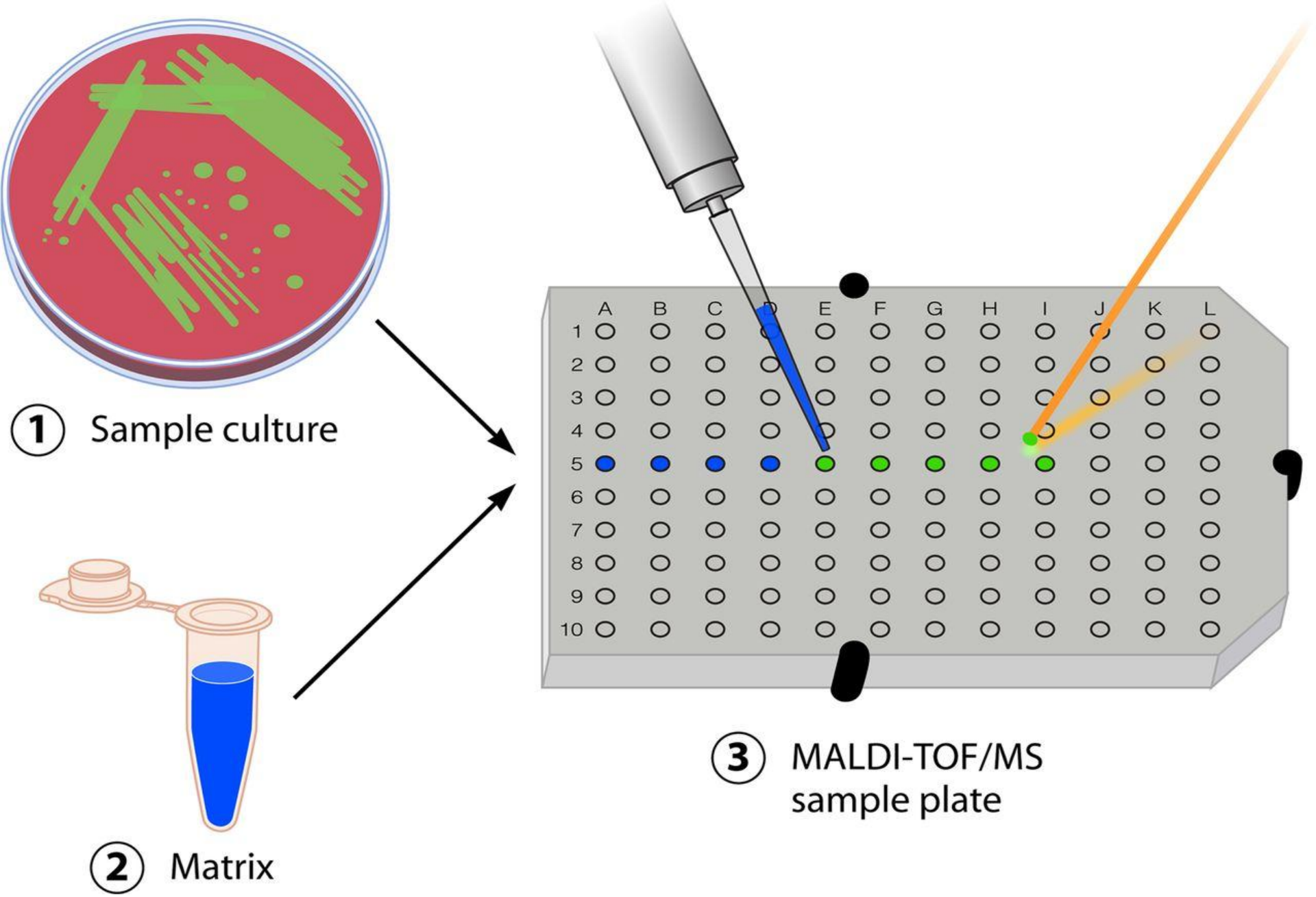
КАЖДОЕ СОЕДИНЕНИЕ ОБЛАДАЕТ ИНДВИДУАЛЬНЫМ НАБОРОМ АТОМОВ И ИХ УНИКАЛЬНЫМ РАСПОЛОЖЕНИЕМ В СТРУКТУРЕ ВЕЩЕСТВА, ЧТО ОБУСЛОВЛИВАЕТ НАЛИЧИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП

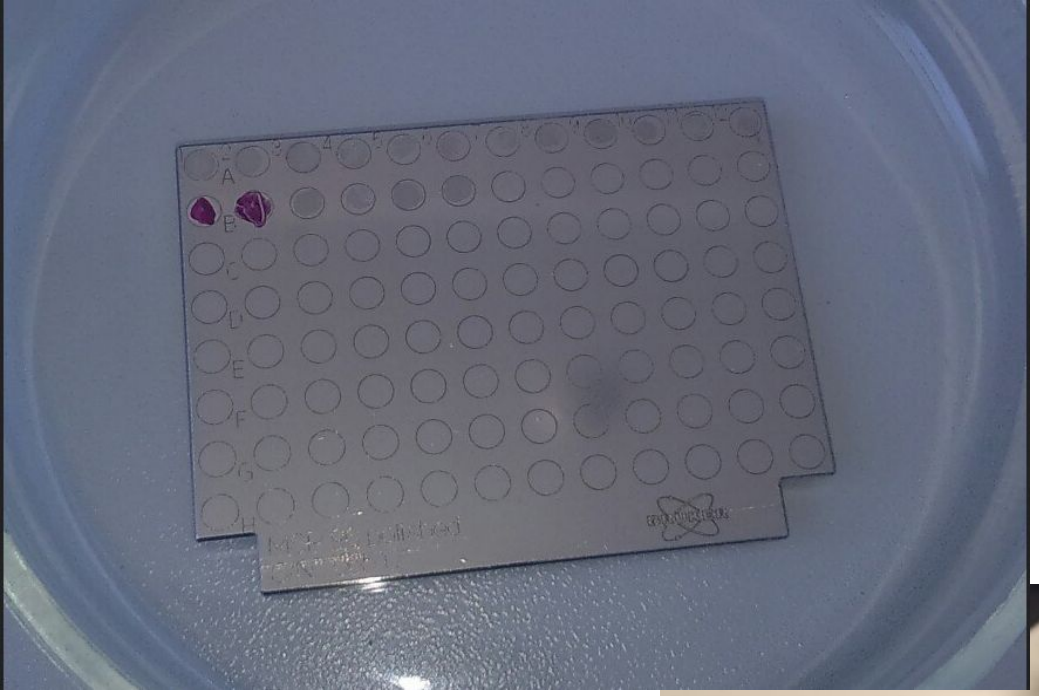
КАЖДАЯ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГРУППА ОБЛАДАЕТ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ МАССОЙ.

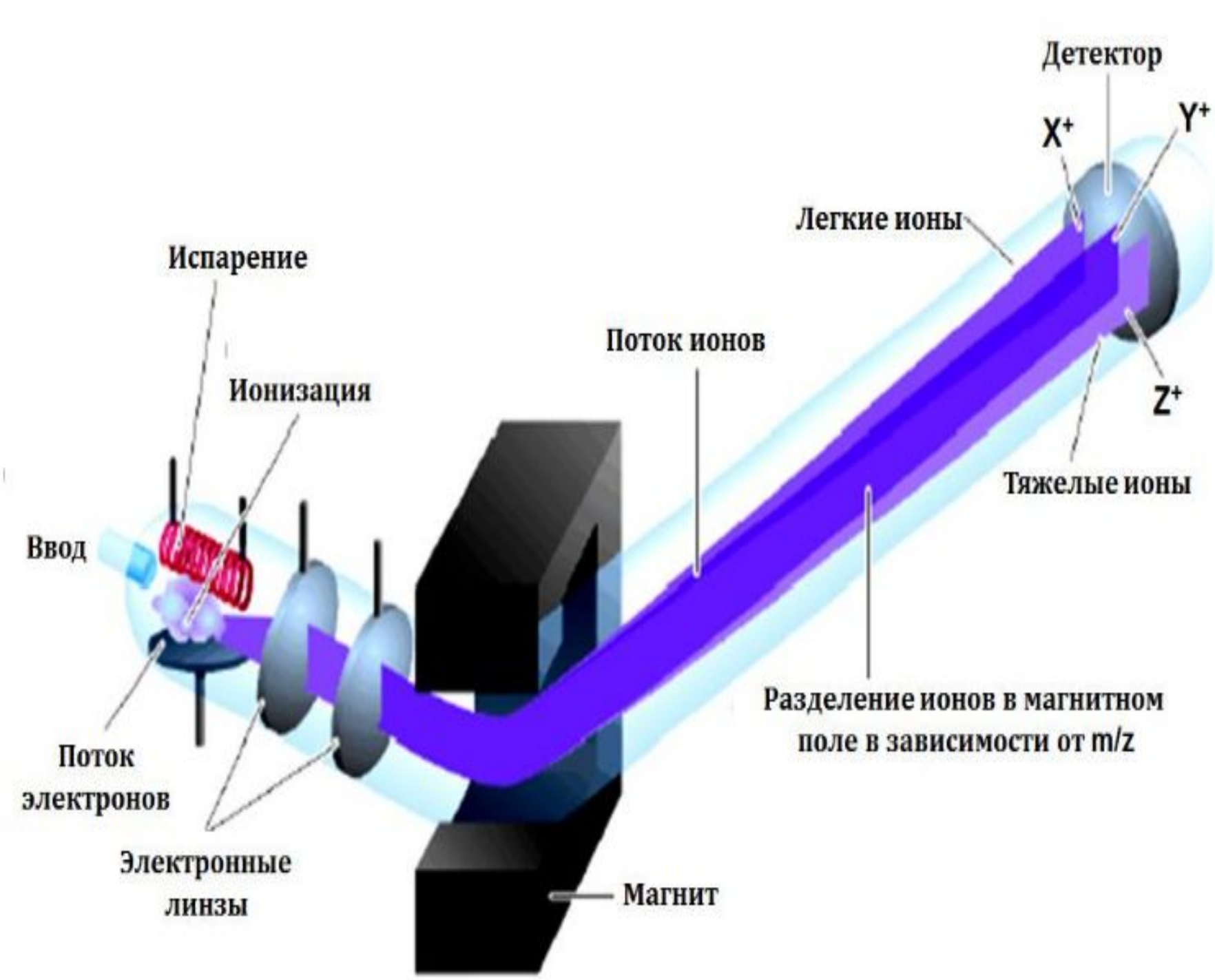
В СУММЕ МАССА ВСЕХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП ДАСТ МАССУ ИСХОДНОГО СОЕДИНЕНИЯ

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
A B C D E F G H I J K L
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

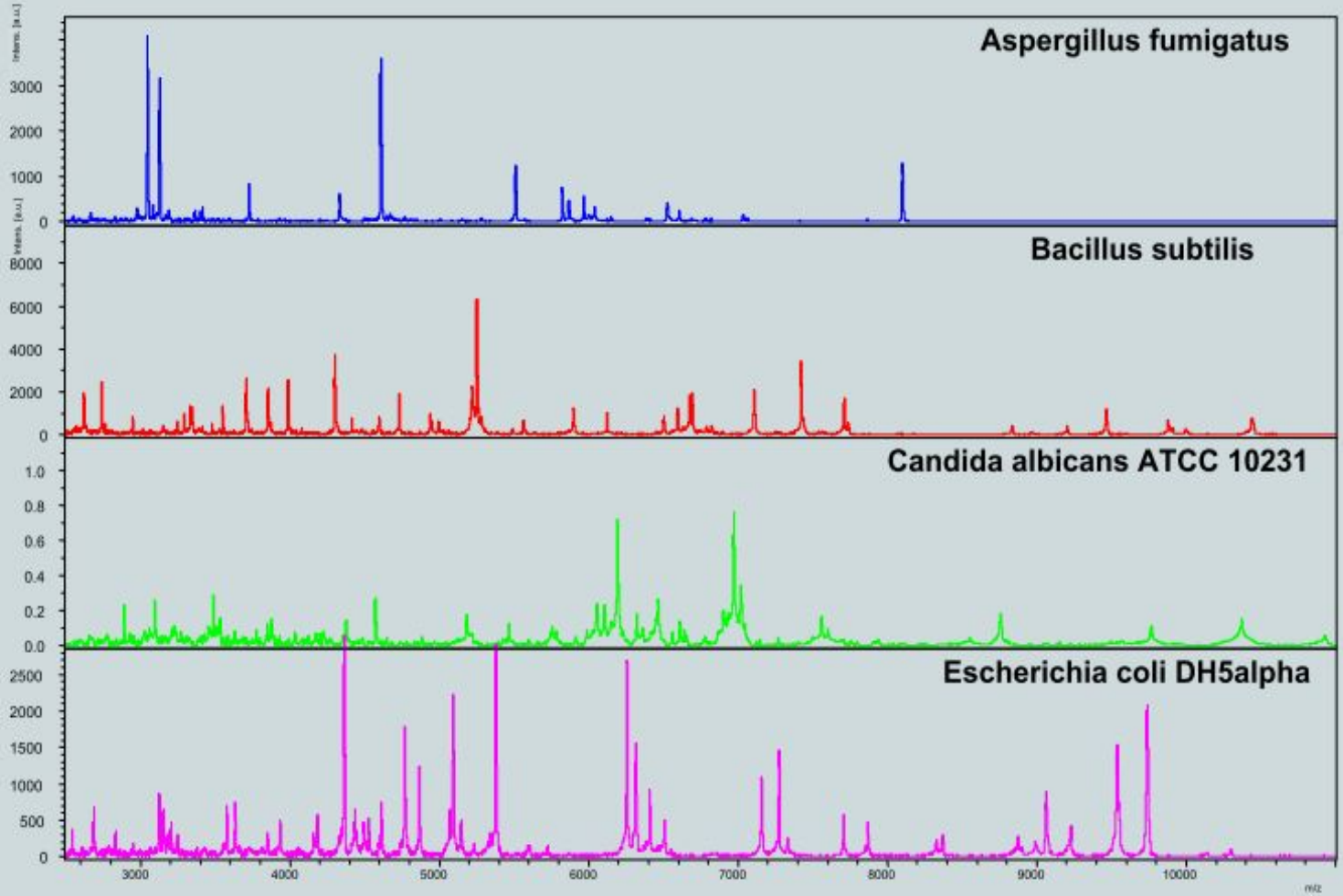

A
B
C
D
E
F
G
H


Детектор
X+
Y+
Легкие ионы
Испарение
Поток ионов
Ионизация
Z+
Тяжелые ионы
Ввод
Разделение ионов в магнитном поле в зависимости от m/z
Поток электронов
Электронные линзы
Магнит

MALDI Biotyper

Broad applicability of MALDI-TOF profiling

gram+ and gram- bacteria, yeasts, filamentous fungi



ghk@bdal.com