**Лекция №** 15

 **Тема «Методы диагностики инфекционных заболеваний**

План:

Сущность методов и применение.

1. Микробиологического метода исследования

2. Микроскопического

3.Бактериологического

4.Серологического

5.Биологического

6.Аллергическии методы исследования.

7.ПЦР-диагностика, иммуноферментные реакции.

 **Конспект лекции.**

Микроскопический метод диагностики используется для изучения окрашенных мазков и мазков из нативного материала в микроскопе и позволяет характеризовать морфологию (форму) возбудителя, его отношение к различным красителям, подвижность. С помощью этого метода можно подтвердить клинический диагноз гонореи, дифтерии, возвратного тифа, сифилиса и некоторых других болезней.

Микробиологический (бактериологический) метод применяют для выделения и изучения чистой культуры возбудителя, т. е. для установления этиологии заболевания. Лабораторная диагностика большинства инфекционных болезней (брюшной тиф, дизентерия, холера, коклюш и др.) основана на применение этого метода.

**Серологический метод.**

Выявляет в сыворотке крови вещества, образующиеся в ответ на внедрение возбудителя в организме человека (антитела). С его помощью подтверждают диагноз бруцеллеза, туляремии, брюшного тифа и др.

**Биологический (эксперементальный) метод –**

Биологическими называют методы исследования, про­водимые на лабораторных животных. Цель этих исследо­ваний: выделение микроорганизмов из исследуемого материала, особенно в тех случаях, когда возбудитель не может быть обнаружен методом посева, например при вирусных заболеваниях, риккетсиоза и т. д.; выделение чистой культуры из материала, загрязненного другими микроорганизмами, не позволяющими искомому возбуди­телю размножаться на искусственной питательной среде; определение некоторых свойств выделенных микроорга­низмов (вирулентность и др.).

Экспериментальное заражение позволяет воспроизве­сти некоторые инфекционные болезни и решить ряд вопросов, касающихся инфекции и иммунитета, эффектив­ности иммунобиологических препаратов, определения их реактивности и превентивных (предупредительных) свойств.

При выборе лабораторного животного необходимо учитывать степень его восприимчивости к изучаемой инфекции и установить, не вызывает ли у него данный возбудитель заболевания в естественных условиях.

**Аллергические пробы, их сущность, применение.**

Аллергические диагностические пробы — высокоспецифичный и чувствительный метод диагностики аллергических и инфекционных заболеваний, в патогенезе которых преобладает аллергический компонент. Пробы основаны на местной или общей реакции сенсибилизированного организма в ответ на введение специфического аллергена.
Особое значение аллергические диагностические пробы имеют при диагностике [аллергических заболеваний](http://www.medical-enc.ru/allergiya/), так как определение аллергена или группы аллергенов, вызвавших состояние гиперчувствительности, позволяет в дальнейшем применять эти аллергены для гипосенсибилизации организма — наиболее специфического и перспективного метода лечения аллергических заболеваний.

Аллергические диагностические пробы применяют также при диагностике некоторых инфекционных, сопровождающихся аллергической сенсибилизацией организма. При диагностике туберкулеза применяют скарификационную [пробу Пирке](http://www.medical-enc.ru/18/tuberculosis.shtml) и внутрикожную пробу Манту. В качестве аллергена применяют разведения сухого очищенного [туберкулина](http://www.medical-enc.ru/18/tuberculin.shtml). При диагностике [бруцеллеза](http://www.medical-enc.ru/2/brucellosis.shtml) применяют  внутрикожную пробу Бюрне. Аллергеном служит раствор бруцеллина, содержащий антигенный набор трех различных возбудителей бруцеллеза. При диагностике [туляремии](http://www.medical-enc.ru/18/tularemia.shtml) применяют внутрикожную пробу с тулярином — убитой нагреванием взвесью [бактерий](http://www.medical-enc.ru/2/bacteria.shtml). При диагностике дизентерии применяют пробу с дизентерином Цуверкалова.

Аллергические диагностические пробы — диагностические реакции, выявляющие состояние повышенной чувствительности организма к соответствующим аллергенам.
Сенсибилизированный организм отвечает на введение аллергена необычной реакцией местного или общего характера, степень которой определяется видовыми и индивидуальными свойствами организма, особенностями аллергена и способами его введения. Аллергическое состояние возникает при ряде инфекционных заболеваний (туберкулез, бруцеллез, пневмококковая пневмония, сап, токсоплазмоз и др.), однако практическое применение аллергические диагностические пробы получили при ограниченном числе заболеваний.

**Полимеразная цепная реакция.**

В настоящее время широко используют новые методические подходы в диагностике заболеваний человека. Среди них ведущее место заняли молекулярно – генетические методы исследования. Они позволили поновому подойти к решению ряда основных вопросов инфекционной и инвазионной патологии. Принципиальный шаг в диагностике, связан с амплификационным методом выявления генетического материала инфекционных и инвазионных агентов. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Одной из важнейших областей применения ПЦР является идентификация патогенных микроорганизмов, являющихся возбудителями заболевания людей, животных и растений.

Полимера́зная цепна́я реа́кция (ПЦР) — экспериментальный метод [молекулярной биологии](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8F%D1%80%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F), позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты ([ДНК](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D0%9A)) в биологическом материале (пробе).

Помимо амплификации (увеличения числа копий) [ДНК](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D0%9A), ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение [мутаций](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D1%83%D1%82%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F), сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для [клонирования](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BB%D0%BE%D0%BD%D0%B8%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B5) [генов](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B5%D0%BD), выделения новых [генов](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B5%D0%BD).

Преимущества ПЦР как метода диагностики инфекционных , инвазивных заболеваний человека.

* Прямое определение наличия возбудителей.

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

* Высокая чувствительность.

ПЦР в настоящее время является наиболее совершенным диагностическим методом, позволяющим при необходимости выявлять единичные клетки возбудителей инфекционных, инвазионных инфекций заболеваний независимо от их природы, даже в тех случаях, когда другими методами (иммунологическими, бактериологическими, микроскопическими и др.) их выявление невозможно.

**Чувствительность ПЦР**

**Тест** – систем составляет 10 – 100 клеток возбудителя в анализируемой пробе, в то время как чувствительность иммунологических тестов колеблется в пределах 103 – 105 клеток.

* Высокая специфичность.

Высокая специфичность метода обусловлена, тем что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного вида фрагмент ДНК либо РНК.

* Простота исполнения, возможность полной автоматизации и быстрота получеия результатов.

Диагностика с помощью ПЦР состоит из трех частей: обработка исследуемого материала, т.е. приготовление образца ДНК или РНК, амплификация, заданного фрагмента и регистрация результатов реакции. За счет автоматизации данных процессов эти процедуры занимают около 6 – 8 часов.

В настоящее время для выявления возбудителей практически всех заболеваний может быть использован один набор приборов и незначительно различающиеся наборы реактивов.

* Использование для анализа непосредственно клинического и патологического материала.

Метод ПЦР позволяет проводить определение возбудителя заболеваний непосредственно в клиническом материале (кровь, сыворотка крови, мазки, смывы, соскобы, слюна, мокрота, спинномозговая жидкость и.т.д.) различном патологическом материале (образцы тканей и органов), а также в материале, получаемом из объектов окружающей среды (вода, почва и т.д.) для проведения анализа не требуется выделения и выращивания культур возбудителя.

Постоянно совершенствующиеся методы обработки исследуемого материала позволяют сократить затрачиваемое время до минимума.

* Малое количество используемого материала для исследования.

Количество исследуемого материала может составлять несколько десятков микролитров, так как в результате проведения ПЦР концентрация анализируемого участка ДНК (РНК) выявляемого возбудителя увеличивается в сотни и тысячи раз.

ПЦР позволяет осуществлять диагностику острых, хронических, латентных инфекций и паразитарных инвазий.

ПЦР тест-системы особенно эффективны при диагностики некультивируемых, труднокультивируемых или персистирующих форм патогенных микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при хронических и латентных инфекциях, при тестировании организмов в объектах внешней среды. При диагностики с помощью ПЦР достигается размножение не тестируемого организма, а только специфического фрагмента его ДНК, являющегося маркерным для данного вида.

* Исключение возможности инфицирования персонала в процессе проведения ПЦР.

Исследуемый материал может быть дезинфицирован химической или термической обработкой в момент его взятия, следовательно, исключается возможность инфицирования персонала в процессе проведения ПЦР.

Задачи, решаемые с помощью ПЦР.

* ПЦР - незаменимый инструмент при идентификации всех микроорганизмов, находящихся в различном биологическом материале на разных стадиях патологического процесса;
* ПЦР позволяет проводить определение антибиотикорезистентности медленнорастущих и труднокультивируемых организмов;
* технология ПЦР изменила способы маркирования штаммов организмов для целей эпидемиологического анализа, тем самым расширив его возможности;
* таксономия микроорганизмов. В последние годы с этой целью начали применять метод ПЦР с произвольными праймерами, которые имеют преимущества перед другими методами (ДНК-гибридизация, геномная дактилоскопия и т.д.);
* в качестве исследуемых образцов в реакцию можно брать любые клетки, биологические жидкости, ткани и объекты внешней среды, причем не только содержащие свежую ДНК (РНК), но и содержащие фрагментированную ДНК.

Контрольные вопросы для закрепления:

 Сущность методов и применение.

1. Микробиологического метода исследования

2. Микроскопическийкого

3.Бактериологического

4.Серологического

5.Биологического

6.Аллергическии методы исследования.

7.ПЦР-диагностика, иммуноферментные реакции.