

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом ПО

Зав. кафедрой

д.м.н., профессор Тихонова Е.П.

Реферат на тему: Принципы и методы диагностики инфекционных заболеваний

Замгла мии мет
зав. Т.П. -

Выполнил: Ординатор 1-года обучения Петров Иван Юрьевич

Проверила : Кузьмина Т.Ю

1 ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

При постановке диагноза инфекционной болезни, как и при диагностике любых других заболеваний, основываются на жалобах больного, анамнезе болезни, эпидемиологическом анамнезе, результатах осмотра, данных лабораторных и инструментальных исследований.

Тем не менее, необходимо учитывать, что инфекционные заболевания имеют ряд особенностей, принципиально отличающих их от других заболеваний, это:

1- Заразительность

2- Специфичность

3- Наличие инкубационного периода и циклическое развитие клинических симптомов

4- Формирование специфического инфекционного иммунитета

На основании выше перечисленных особенностей должна строиться принципиальная врачебная тактика в отношении диагностики инфекционных заболеваний на амбулаторном, догоспитальном и госпитальном этапе постановки предварительного диагноза. Эти ориентиры могут оказать значимую помощь в дифференциальной диагностике инфекционных заболеваний от неинфекционных, правильно и своевременно сориентироваться во врачебной тактике.

Выявить наличие особенностей возможно при грамотном сборе анамнестических данных.

Из Эпидемиологического анамнеза мы можем выяснить, присуще ли заболеванию пациента заразительность (болеет ли в настоящий момент или в определённые сроки до настоящего времени заболеванием со схожими симптомами люди из близкого окружения); в какие сроки укладывается инкубационный период заболевания (например, сыпь при эпидемическом сыпном тифе появляется на 4-6 день болезни, а при брюшном тифе на 8-10 день);

Из анамнеза заболевания: порядок возникновения клинических симптомов заболевания (например, при пищевых токсикоинфекциях, сначала появляется рвота, затем диарея, при холере-наоборот, диарея предшествует рвоте).

Из анамнеза жизни пациента мы можем выяснить какими заболеваниями он переболел, тем самым можем сразу исключить из дифференциально-диагностического ряда ранее перенесённые инфекционные заболевания, сформировавшие специфический иммунитет (например, детские инфекции).

После постановки предварительного диагноза определяется дальнейшая тактика обследования и проведения противоэпидемических мероприятий (изоляция больного, выявление лиц, с которыми общался больной, возможных источников возбудителя инфекции и механизма передачи возбудителя инфекции).

2.ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Лабораторные исследования играют важную роль в установлении диагноза инфекционных болезней, назначении этиотропной терапии, проведении контроля за эффективностью лечения. Процесс специфической лабораторной диагностики основан на выявлении возбудителя и ответной реакции организма человека в ходе инфекционного процесса. Он состоит из трех этапов: сбора материала, транспортировки и его исследования в лаборатории. К проведению каждого этапа предъявляют определенные требования, от соблюдения которых зависит эффективность лабораторной диагностики. Задача врача заключается в правильном выборе метода исследования и грамотной оценке его результатов.

Лабораторные методы диагностики различны по чувствительности и специфичности.

Чувствительность метода отражает вероятность того, что результат теста будет положительным у инфицированного пациента и определяется отношением общего числа положительных результатов к общему числу инфицированных пациентов. Чем выше чувствительность теста, тем меньше вероятность получения ложноотрицательных результатов. Критерий специфичности отражает вероятность того, что результат теста будет положительным у неинфицированного пациента, и его вычисляют как отношение общего числа отрицательных результатов к общему числу неинфицированных пациентов. Чем меньше специфичность, тем больше вероятность получения ложноположительных результатов. Оба показателя выражают в процентах.

2.1 Микробиологический метод

Микробиологический метод диагностики основан на обнаружении возбудителей в биологическом материале. Используют светооптическую и электронную микроскопию.

Микробиологический метод широко применяют в диагностике инфекционных болезней бактериальной, протозойной этиологии и, реже, вирусных болезней.

В практике работы бактериологической лаборатории микроскопическое исследование в большинстве случаев имеет значение ускоренной ориентировочной диагностики. Основными задачами микроскопии служат выявление возбудителя в клиническом материале, ориентировочная идентификация на основании определения характерных морфологических и тинкториальных признаков бактерий, а также изучение окрашенных мазков из колоний чистых культур.

Материалом для микроскопического исследования могут быть кровь, костный мозг, ликвор, пунктаты лимфатических узлов, фекалии, дуоденальное содержимое и желчь, моча, мокрота, отделяемое мочеполовых путей, биоптаты тканей, мазки со слизистой оболочки ротовой полости, небных миндалин, носа и др.

Для обнаружения «кровепаразитов», например простейших (малярийные плазмодии, трипаномы, лейшмании, бабезии) и гельминтов (микрофилярии), исследуют препараты «тонкий мазок» и/или «толстая капля» крови.

Препарат «толстая капля» готовят двумя способами: а) к капле крови на месте прокола (на пальце, мочке уха) прикасаются предметным стеклом и круговыми движениями распределяют каплю до диаметра 15—20 мм, на предметное стекло целесообразно нанести 2 капли; б) на предметном стекле готовят вначале мазок несколько толще обычного, затем, пока он еще не высох, на него наносят 1 или 2 капли крови, которые спонтанно растекаются равномерными дисками. Подсыхать «толстые капли» должны постепенно на воздухе, без подогрева, в условиях защиты их от повреждения насекомыми. Препараты крови окрашивают без предварительной фиксации по Романовскому—Гимзе.

Для приготовления тонкого мазка делают отпечаток крови вблизи края предметного стекла, затем ребром под углом 45° подводят к капле шлифованное стекло и после растекания крови вдоль его края непрерывным движением распределяют кровь по поверхности предметного стекла. Полученный препарат фиксируют и окрашивают.

Спинномозговую жидкость для микробиологического исследования отбирают в стерильную пробирку во время люмбальной пункции. Для приготовления препарата используют осадок, образующийся спонтанно или в результате центрифугирования.

Мазки со слизистой оболочки ротовой полости берут натошак или через 2 ч после еды стерильным ватным тампоном, мазок-отпечаток готовят на предметном стекле. При наличии пленки последнюю снимают стерильным пинцетом. Материал из носовой полости забирают стерильным ватным тампоном, который вводят вглубь полости носа. Мазок из носоглотки берут стерильным заднеглоточным тампоном, вводя его осторожно через носовое отверстие в носоглотку. Для проведения анализов на дифтерию исследуют одновременно пленки и слизь из носа и глотки. Материал из носа и глотки берут разными тампонами.

Мочу для микроскопического исследования собирают в стерильную посуду после тщательного туалета наружных половых органов. Для приготовления препарата используют осадок мочи.

Микроскопическому исследованию подвергают нативные (нефиксированные, неокрашенные) и окрашенные препараты. В первом случае выявляют живые микроорганизмы в препарате «висячая капля» или «раздавленная капля», оценивая подвижность и морфологические свойства возбудителя. Например, темнопольную микроскопию нативных препаратов используют для диагностики спирохетозов (первичного сифилиса, лептоспироза, эпидемического (вшиного) возвратного тифа), кандидоза или других грибковых заболеваний. В этих случаях результат микроскопического исследования дает основание для постановки диагноза.

Наиболее широко применяют микроскопию микроорганизмов в окрашенном состоянии, в частности для диагностики паразитарных болезней (малярия, амебиаз, лямблиоз, лейшманиоз, гельминтозы). Для окраски препаратов используют ориентировочные, специальные и дифференцирующие методы. Ориентировочная окраска позволяет оценить общую морфологию микроорганизма. С этой целью применяют стандартные красители — фуксин или метиленовый синий.

Среди специальных методов наиболее часто используют окраску по Граму. Этот метод выявляет способность бактерий удерживать краситель кристаллический фиолетовый (или генциановый фиолетовый) либо обесцвечиваться в спирте. Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, а грамотрицательные — в красный, так как они обесцвечиваются в спирте и их

дополнительно окрашивают фуксином. Окраска возбудителей по Граму позволяет определить первичный выбор средств антибактериальной терапии.

К специальным методам относят окраску по Цилю— Нильсену, выявляющую кислото- и спиртоустойчивые палочки, в частности микобактерии туберкулеза, которые окрашиваются в красный цвет, а остальные микроорганизмы — в синий.

Дифференцирующими называют методы окраски отдельных элементов бактериальной клетки. Например, окраска метакроминовых (вольютинных) включений в бактериях (по Нейссеру, Майеру), окраска капсул (по Гиссу, Лейфсону, Антони), спор, жгутиков (по Леффлеру, Бейли, Грею и др.), клеточной стенки, хроматиновых (ядерных) элементов (по Романовскому—Гимзе и Пекарскому).

К микроскопическим методам исследования относят иммунофлюоресценцию (люминесцентная микроскопия), используемую для диагностики бактериальных и вирусных инфекций и основанную на применении антител, меченных флюоресцирующим красителем. Более подробно данный метод рассматривается в разделе «Иммунологические методы исследования».

Эффективность микроскопического метода определяется его чувствительностью и специфичностью. Специфичность ограничивается возможной ошибочной идентификацией возбудителя из-за артефактов. Кроме того, при проведении микроскопического исследования имеют значение техника исследования; например, при диагностике малярии чувствительность исследования крови методом «толстой капли» в 20—40 раз выше, чем при исследовании методом тонкого мазка, поскольку данный препарат позволяет просматривать больший объем крови, а кроме того, плазмодии в препарате располагаются внеклеточно, что облегчает их обнаружение и количественную оценку. Тем не менее чувствительность метода «толстой капли», проводимого по стандартам ВОЗ (исследование минимум 100 полей зрения в течение минимум 5 мин), все же не превышает 95 % из-за неравномерности распределения малярийных плазмодиев крови, особенно при низком уровне паразитемии.

Важным способом повышения чувствительности микробиологического метода является использование различных способов концентрации патогенов, например осаждение или флотация пробы при исследовании кала и фильтрация через миллипоровые фильтры проб крови, мочи, спинномозговой жидкости.

Повышению эффективности микроскопического исследования способствует количественное определение выявленного паразита в поле зрения или единице объема исследуемого материала. В частности, при малярии (особенно при обнаружении *P. falciparum*) важно определение интенсивности паразитемии.

Количественная оценка микрофлоры в мазке, а также выявление микробных ассоциаций важны в случае необходимости определения этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов. Известно, что максимальная определяемая концентрация бактерий в мазке из нативного материала составляет 10^8 клеток в 1 мл.

Для большинства видов исследуемого материала этиологически значимым считается обнаружение условно-патогенных бактерий определенного вида в концентрации не менее 10^5 — 10^6 клеток в 1 мл, поэтому чувствительность микроскопического метода в большинстве случаев удовлетворяет потребностям клинической микробиологии.

2.2 Бактериологический метод

Применение бактериологического метода дает возможность выделить возбудителя в чистой культуре из материала, полученного от больного, и идентифицировать его на основании изучения комплекса свойств. Большинство бактерий способны к культивированию на различных искусственных питательных средах (кроме хламидий и риккетсий), поэтому бактериологический метод имеет важное значение в диагностике многих инфекционных болезней.

В случае получения положительного результата бактериологический метод позволяет определить чувствительность выделенного возбудителя к антимикробным препаратам. Однако эффективность указанного исследования зависит от многих параметров, в частности от условий сбора материала и его транспортировки в лабораторию.

К основным требованиям, предъявляемым к отбору и транспортировке материала для бактериологического исследования, относят:

- взятие материала до начала этиотропного лечения;
- соблюдение условий стерильности при сборе материала;

- техническую правильность сбора материала;
- достаточное количество материала;
- обеспечение температурного режима хранения и транспортировки материала;
- сведение к минимальному промежутку времени между сбором материала и посевом на плотные питательные среды.

Транспортировка материала в лабораторию должна быть осуществлена по возможности немедленно, но не более чем в течение 1—2 ч после его взятия. Пробы материала должны находиться при определенном температурном режиме; в частности, стерильные в норме материалы (кровь, спинномозговая жидкость) хранят и доставляют в лабораторию при 37 °С. Нестерильные материалы (моча, отделяемое дыхательных путей и др.) хранят при комнатной температуре не более 1—2 ч или не более суток при 4 °С (условия бытового холодильника). При невозможности доставки проб в лабораторию в регламентированные сроки рекомендуют использовать транспортные среды, предназначенные для сохранения жизнеспособности возбудителей в условиях консервации.

- Кровь для исследования следует брать у больного в период подъема температуры тела, в начале появления лихорадки. Рекомендуется исследовать 3—4 пробы крови, взятые с интервалом 4—6 ч, что обоснованно с точки зрения снижения риска «упустить» транзиторную бактериемию и повышения возможности подтвердить этиологическую роль выделенной из крови условно-патогенной микрофлоры (например, *Staphylococcus epidermidis*), если эта микрофлора обнаруживается в нескольких пробах венозной крови. Пробу крови в количестве 10 мл у взрослого и 5 мл у детей засевают минимум в два флакона со средой для аэробных и анаэробных микроорганизмов в соотношении 1:10. Желательно однократное исследование и артериальной крови.
 - Взятие спинномозговой жидкости (СМЖ) производит врач при люмбальной пункции в количестве 1—2 мл в сухую стерильную пробирку. Пробу немедленно доставляют в лабораторию, где к ее исследованию приступают также немедленно. При отсутствии такой возможности материал сохраняется при 37 °С в течение нескольких часов. Существенно повышает количество положительных результатов бактериологического исследования посев 1—2 капель СМЖ в пробирку, содержащую полужидкую среду с глюкозой, и в чашку Петри с «кровяным» агаром. Для пересылки материала используют изотермальные ящики, грелки, термосы или любую другую упаковку, где поддерживается температура около 37 °С.
 - Испражнения для бактериологического исследования отбирают с помощью стерильных деревянных шпателей в количестве 3—5 г в стерильный сосуд с плотно закрывающейся крышкой. Исследование взятого материала должно быть начато не позже чем через 2 ч. Если невозможно приступить к исследованию в течение этого времени, следует отобрать небольшое количество материала, который помещают в соответствующую транспортную среду. При отборе испражнений следует стремиться направлять для исследования патологические примеси (слизь, гной, частицы эпителия и др.), если они имеются, избегая попадания в материал примеси крови, обладающей бактерицидными свойствами.
- Для взятия материала могут быть использованы ректальные тампоны (с ватным наконечником). Тампон должен быть увлажнен стерильным изотоническим раствором натрия хлорида или транспортной средой (но не масляным гелем). Его вводят rectum на глубину 5—6 см и, поворачивая тампон, осторожно его извлекают, контролируя появление на тампоне фекальной окраски. Тампон помещают в сухую пробирку, если к исследованию материала приступят в течение 2 ч, в ином случае — в транспортную среду.
- Мочу (средняя порция свободно выпущенной мочи) в количестве 3—5 мл собирают в стерильную посуду после тщательного туалета наружных половых органов. Предпочтительней отбирать утренние порции мочи.
 - Желчь собирают во время дуоденального зондирования в процедурном кабинете отдельно по порциям А, В и С в три стерильные пробирки, соблюдая правила асептики.
 - Промывные воды желудка собирают в стерильные банки в количестве 20—50 мл. Следует иметь в виду, что промывание желудка в этих случаях проводят только индифферентными (не обладающими бактериостатическим или бактерицидным действием на микроорганизмы) растворами — лучше кипяченой водой (без добавления соды, перманганата калия и пр.).
 - Мокрота. Утреннюю мокроту, выделяющуюся во время приступа кашля, собирают в стерильную банку. Перед откашливанием больной чистит зубы и полощет рот кипяченой водой с целью механического удаления остатков пищи, слущенного эпителия и микрофлоры ротовой полости.

- Промывные воды бронхов. При бронхоскопии вводят не более 5 мл изотонического раствора натрия хлорида с последующим его отсасыванием в стерильную пробирку.
- Отделяемое глотки, ротовой полости и носа. Материал из ротовой полости берут натошак или через 2 ч после еды стерильным ватным тампоном либо ложечкой со слизистой оболочки и ее пораженных участков у входов протоков слюнных желез, поверхности языка, из язвочек. При наличии пленки последнюю снимают стерильным пинцетом. Материал из носовой полости забирают сухим стерильным ватным тампоном, который вводят в глубь полости носа. Материал из носоглотки берут стерильным заднеглоточным ватным тампоном, который осторожно вводят через носовое отверстие в носоглотку. Если при этом начинается кашель, тампон не удаляют до окончания кашля. Для проведения анализа на дифтерию исследуют одновременно пленки и слизь из носа и глотки, беря материал разными тампонами.

Исследуемый материал засевают на плотные питательные среды, используя специальные методики для получения роста отдельных колоний микроорганизмов, которые далее отсевают с целью выделения чистой культуры возбудителя.

Определенные виды бактерий выделяют, используя элективные (избирательные) среды, которые задерживают рост посторонних микроорганизмов или содержат вещества, стимулирующие рост определенных патогенных микробов.

Выделенные на питательных средах микроорганизмы идентифицируют, т.е. определяют видовую или типовую их принадлежность. В последнее время для идентификации в практике здравоохранения используют микротест-системы, представляющие собой панели с набором дифференциально-диагностических сред, что ускоряет исследование. Микротест-системы применяют и для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам методом разведения антибиотика в жидкой питательной среде.

Оценивая результаты бактериологического исследования, врач должен учитывать, что отрицательный результат не всегда означает отсутствие возбудителя и может быть связан с применением антимикробных препаратов, высокой микроцидной активностью крови, техническими погрешностями. Обнаружение патогенного микроба в материале от больного вне связи с клинической картиной возможно в случае рекон-валесцентного, здорового или транзиторного бактерионосительства.

Выделение из крови при соблюдении всех правил асептики условно-патогенных микроорганизмов (эпидермальный стафилококк, кишечная палочка) и даже сапрофитов следует считать проявлением бактериемии, особенно если эти микробы обнаружены больше чем в одной пробе материала или в разных субстратах (кровь, моча), поскольку при снижении иммунореактивности организма эти и другие «непатогенные» микроорганизмы могут быть возбудителями инфекционных процессов, в том числе и сепсиса.

Определенную сложность представляет трактовка результатов бактериологического исследования нестерильных сред, а именно доказательство этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов. В этом случае учитывают в комплексе такие показатели, как вид выделенных культур, количество микробных клеток данного вида в материале, повторное их выделение в течение заболевания, присутствие монокультуры или ассоциации микроорганизма.

2.3 Вирусологический метод

Вирусологический метод включает два основных этапа: выделение вирусов и их идентификацию. Материалами могут быть кровь, другие биологические и патологические жидкости, биоптаты органов и тканей.

Вирусологическое исследование крови часто проводят с целью диагностики арбовирусных инфекций. В слюне могут быть обнаружены вирусы бешенства, эпидемического паротита, простого герпеса. Носоглоточные смывы служат для выделения возбудителей гриппа и других ОРВИ, кори. В смывах с конъюнктивы обнаруживают аденовирусы. Из фекалий выделяют различные энтеро-, адено-, рео- и ротавирусы.

Для выделения вирусов используют культуры клеток, куриные эмбрионы, иногда лабораторных животных. Большинство патогенных вирусов отличается наличием тканевой и типовой специфичности, например, полиовирус репродуцируется только в клетках приматов, поэтому для выделения определенного вируса используют соответствующую культуру ткани. Для выделения неизвестного возбудителя целесообразно одномоментно заражать 3—4 культуры клеток, предполагая, что одна из них может оказаться чувствительной. Наличие вируса в зараженных культурах определяют по

развитию специфической дегенерации клеток, т.е. цитопатогенному действию, обнаружению внутриклеточных включений, а также на основе выявления специфического антигена методом иммунофлюоресценции, положительных реакций гемадсорбции и гемагглютинации. Эмбрионы птиц с их малодифференцированными тканями пригодны для культивирования очень многих вирусов. Чаще всего используют эмбрионы кур. При размножении в эмбрионах вирусы могут вызвать их гибель (арбовирусы), появление изменений на хорион-аллантоисной оболочке (оспенные вирусы) или в теле эмбриона, накопление в эмбриональных жидкостях гемагглютининов (вирусы гриппа, паротита) и комплементсвязывающего вирусного антигена.

Вирусы идентифицируют с помощью иммунологических методов: реакции торможения гемагглютинации, связывания комплемента, нейтрализации, преципитации в геле, иммунофлюоресценции.

2.4 Биологический метод

Биологический метод состоит в заражении различным материалом (клиническим, лабораторным) лабораторных животных для индикации возбудителя, а также для определения некоторых свойств микроорганизмов, характеризующих их патогенность (токсигенность, токсичность, вирулентность). В качестве лабораторных животных используют белых мышей, белых крыс, морских свинок, кроликов и др.

Воспроизведение заболевания у животного — абсолютное доказательство патогенности выделенного микроорганизма (в случае бешенства, столбняка и др.). Поэтому биологическая проба на животных является ценным и достоверным диагностическим методом, особенно при тех инфекциях, возбудители которых в исследуемых биологических средах организма человека содержатся в малых концентрациях и плохо или медленно растут на искусственных средах.

2.5 Иммунологический метод

Иммунологический метод (серологический) включает исследования сыворотки крови, а также других биологических субстратов для выявления специфических антител и антигенов. Классическая серодиагностика основана на определении антител к выявленному или предполагаемому возбудителю. Положительный результат реакции свидетельствует о наличии в исследуемой сыворотке крови антител к антигенам возбудителя, отрицательный результат указывает на отсутствие таковых. Обнаружения в исследуемой сыворотке крови антител к возбудителю ряда инфекционных болезней недостаточно для постановки диагноза, поскольку оно может отражать наличие постинфекционного или поствакцинального иммунитета, поэтому исследуют «парные» сыворотки крови, первую, взятую в первые дни болезни, и вторую, взятую с интервалом 7—10 дней. В этом случае оценивают динамику нарастания уровня антител.

Диагностически значимо увеличение титра антител в исследуемой сыворотке крови не менее чем в 4 раза относительно первоначального уровня. Этот феномен называют сероконверсией. При редких инфекционных болезнях, а также вирусных гепатитах, ВИЧ-инфекции и некоторых других факт наличия антител свидетельствует об инфицированности пациента и имеет диагностическое значение. Кроме определения титра антител, при проведении серологических исследований можно установить изотип антител. Известно, что при первой встрече организма человека с возбудителем в остром периоде болезни выявляют более быстрое нарастание антител, принадлежащих к IgM, уровень которых, достигая максимального значения, затем снижается. В более поздние сроки болезни повышается количество IgG-антител, которые дольше сохраняются и определяются в периоде реконвалесценции. При повторной встрече с возбудителем благодаря иммунологической памяти реакции гуморального иммунитета проявляются более быстрой продукцией IgG-анти-тел, а антитела класса M вырабатываются в незначительном количестве. Обнаружение IgM-антител свидетельствует о наличии текущего инфекционного процесса, а наличие IgG-антител — о перенесенной в прошлом инфекции или поствакцинальном иммунитете.

Учитывая особенности первичного и вторичного иммунного ответа, анализ соотношения IgM- и IgG-антител позволяет в некоторых случаях дифференцировать стадию инфекционного процесса (разгар заболевания, реконвалесценция, рецидив). Например, в случае вирусного гепатита А (ГА) надежным методом диагностики служит определение анти-НАVIgM-антител в сыворотке крови. Их выявление свидетельствует о текущей или недавно возникшей HAV-инфекции.

Серологическое исследование для обнаружения антител при инфекционных заболеваниях является более доступным методом лабораторной диагностики, чем выделение возбудителя. Иногда положительная серологическая реакция служит единственным доказательством встречи и

взаимодействия организма с возбудителем соответствующего инфекционного заболевания. Кроме того, ряд заболеваний со сходной клинической картиной (например, риккетсиозы, энтеровирусные инфекции) могут быть дифференцированы лишь серологически, что отражает значение серологических методов в диагностике инфекционных болезней.

2.6 Серологические реакции

Серологические реакции обозначают в соответствии с феноменами, сопровождающими образование комплекса антиген — антитело при взаимодействии различных по свойствам компонентов.

Различают реакции агглютинации, преципитации и лизиса.

· Реакция агглютинации (РА) основана на применении корпускулярного антигена (взвесь бактерий, sensibilizированных эритроцитов, частиц латекса и др.), взаимодействующего со специфическими антителами, в результате чего образующийся комплекс антиген — антитело выпадает в виде осадка. Эту реакцию широко применяют в лабораторной практике для серологической диагностики бактериальных инфекций и для идентификации выделенных микроорганизмов.

РА используют для диагностики многих инфекционных болезней: бруцеллеза (реакции Райта, Хеддльсона), туляремии, лептоспироза (РАЛ — реакция агглютинации и лизиса лептоспир), листериоза, сыпного тифа (РАР — реакция агглютинации риккетсий), шигеллеза, иерсиниоза, псевдотуберкулеза и др.

- Реакция непрямой, или пассивной, агглютинации (РНГА или РИГА). Для постановки этой реакции используют эритроциты животных (барана, обезьяны, морских свинок, некоторых птиц), sensibilizированных антителами или антигеном, что достигается инкубацией взвеси эритроцитов и раствора антигена или иммунной сыворотки.

Диагностикумы, полученные на основе эритроцитов, sensibilizированных антигенами, называют антигенными эритроцитарными диагностикумами

Они предназначены для определения антител в серийных разведениях сывороток крови, например эритроцитарные шигеллезные диагностикумы, эритроцитарные сальмонеллезные О-диагностикумы. Соответственно диагностикумы на основе эритроцитов, sensibilizированных специфическими иммуноглобулинами, называют антительными (иммуноглобулиновыми) диагностикумами и они служат для выявления антигенов в различном материале, например эритроцитарный иммуноглобулиновый дифтерийный диагностикум для РНГА, применяемый для выявления дифтерийного экзотоксина коринебактерий в жидкой питательной среде при посеве в нее материала из носа и ротоглотки.

Реакцию гемагглютинации применяют для диагностики как бактериальных (брюшной тиф, паратифы, дизентерия, бруцеллез, чума, холера и др.), так и вирусных (грипп, аденовирусные инфекции, корь и др.) инфекций. По чувствительности и специфичности РНГА превосходит РА.

- Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) используют для титрования противовирусных антител в сыворотках крови, а также с целью установления типовой принадлежности выделенных вирусных культур. РТГА можно применить для диагностики тех вирусных инфекций, возбудители которых обладают гемагглютинирующими свойствами.

Принцип метода состоит в том, что сыворотка, содержащая антитела к конкретному типу вируса, подавляет его гемагглютинирующую активность и эритроциты остаются неагглютинированными.

- Реакция торможения (задержки) пассивной гемагглютинации (РТПГА). В РТПГА участвуют три компонента: иммунная сыворотка, антиген (исследуемый материал) и sensibilizированные эритроциты.

Если в исследуемом материале есть антиген, специфически реагирующий с антителами иммунной стандартной сыворотки, то он связывает их, и при последующем добавлении эритроцитов, sensibilizированных антигеном, гомологичным сыворотке, гемагглютинация не наступает.

РТПГА применяют для обнаружения микробных антигенов, для количественного их определения, а также для контроля специфичности РПГА.

- Реакция латекс агглютинации (РЛА). В качестве носителя антител (иммуноглобулинов) используют частицы латекса. РЛА является экспресс-методом диагностики инфекционных болезней, учитывая время проведения (до 10 мин) и возможность обнаружить антиген в небольшом объеме исследуемого материала.

РЛА применяют для индикации антигенов *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* типа b, *Neisseria meningitidis* в цереброспинальной жидкости, выявления стрептококков группы A в мазках из

зева, для диагностики сальмонеллеза, иерсиниозов и других заболеваний. Чувствительность метода составляет 1—10 нг/мл, или 10³—10⁶ бактериальных клеток в 1 мкл.

-Реакция коаггутинации (РКоА) основана на способности белка А стафилококков присоединять специфические иммуноглобулины. РКА — метод экспресс-диагностики — служит для выявления растворимых термостабильных антигенов в секретах человека и в составе циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Обнаружение специфических антигенов в составе ЦИК требует их предварительного осаждения из сыворотки крови.

· Реакция преципитации. В реакции преципитации (РП) в результате взаимодействия антител с высокодисперсными растворимыми антигенами (белки, полисахариды) образуются комплексы с участием комплемента — преципитаты. Это чувствительный тест, используемый для выявления и характеристики разнообразных антигенов и антител. Простейшим примером качественной РП является образование непрозрачной полосы преципитации в пробирке на границе наслоения антигена на иммунную сыворотку — реакция кольцепреципитации. Широко применяют различные разновидности РП в полужидких гелях агара или агарозы (метод двойной иммунодиффузии, метод радиальной иммунодиффузии, иммуноэлектрофорез).

· Реакция связывания комплемента (РСК) основана на феномене гемолиза с участием комплемента, т.е. способна выявлять только комплементсвязывающие антитела.

РСК широко применяют для диагностики многих бактериальных и вирусных инфекций, риккетсиозов, хламидиозов, инфекционного мононуклеоза, протозойных инфекций, гельминтозов. РСК является сложной серологической реакцией, в которой участвуют две системы: исследуемая (сыворотка крови), представленная системой антиген — антитело и комплементом, и гемолитическая (эритроциты барана + гемолитическая сыворотка). Гемолитическая сыворотка представляет собой инаktivированную прогреванием сыворотку крови кролика, иммунизированного эритроцитами барана. Она содержит антитела против эритроцитов барана.

Положительный результат РСК — отсутствие гемолиза — наблюдают в случае, если в исследуемой сыворотке содержатся антитела, гомологичные антигену. При этом образовавшийся комплекс антиген — антитело связывает комплемент, а в отсутствии свободного комплемента добавление гемолитической системы не сопровождается гемолизом. В случае отсутствия в сыворотке антител, соответствующих антигену, образования комплекса антиген — антитело не происходит, комплемент остается свободным и сыворотка вызывает гемолиз эритроцитов, т.е. наличие гемолиза — это отрицательный результат реакции.

2.7 Иммунологические методы с применением химических меток

Иммунологические реакции, такие, как иммунофлюоресценция, иммуноферментный анализ, радиоиммунологический анализ, иммунный блоттинг характеризуется применением различных способов детекции (обнаружения) комплекса антиген — антитело на основе химических или физических меток (флюоресцирующих веществ, ферментсубстратных взаимодействий, приводящих к окрашиванию реакционной смеси, радиоактивных изотопов), что имеет целью достижения большей чувствительности и специфичности анализа по сравнению с серологическими методами, основанными на естественных феноменах.

-Иммунофлюоресцентный метод. Иммуно-флюоресценция (ИФ) представляет собой люминесценцию биологического объекта в ультрафиолетовом спектре под микроскопом после его предварительной обработки специфическими антителами, мечеными флюорохромом. ИФ была разработана Кунсом в 1942 г. и применяется как метод экспрессдиагностики инфекционных болезней. ИФ — универсальный иммунохимический метод, сочетающий достаточно точный морфологический анализ со специфичностью иммунологических методов.

Люминесцирующие сыворотки получают с помощью химической реакции между специфическими антителами иммунной сыворотки и флюоресцирующим красителем флюорохромом, в качестве которого чаще всего используют изотиоционат флюоресцеина. Такие меченые антитела называют конъюгатом. На практике используют флюорохромы, имеющую желто-зеленую, желтую и красную флюоресценцию.

Меченная флюорохромом сыворотка образует с антигеном комплекс антиген — антитело, который становится доступным наблюдению под микроскопом в ультрафиолетовых лучах, возбуждающих свечение флюорохрома. Метод ИФ применяют в различных модификациях, в частности используют прямой и непрямой варианты.

Метод прямой ИФ (синонимы: реакция иммунофлюоресценции — РИФ, метод флюоресцирующих антител — МФА) используют только для определения антигена: обнаружение бактерий и риккетсий в мазках, выявление вирусов в зараженных клетках, изучение клеточных антигенов.

Примером применения ИФ с целью выявления вирусных антигенов является диагностика бешенства у животных. Мазки-отпечатки мозга погибших животных обрабатывают люминесцирующей антирабической сывороткой. При положительном результате в цитоплазме нейроцитов наблюдают глыбки ярко-зеленого цвета (тельца Бабеша—Негри), представляющие собой скопление вирусных нуклеокапсидов. На обнаружении антигенов вирусов в мазках-отпечатках со слизистой оболочки основана экспресс-диагностика гриппа, парагриппа и аденовирусной инфекции.

Метод непрямой флюоресценции (реакция непрямой иммунофлюоресценции — РНИФ) обладает рядом преимуществ по сравнению с РИФ. Ее используют не только для определения антигенов, но и для титрования антител; реакция обладает большей чувствительностью, так как позволяет с помощью одной и той же антивидовой меченой сывороткой обнаружить различные бактериальные и вирусные антигены при применении в каждом случае на первом этапе постановки реакции немеченых специфических иммунных сывороток. Определение специфических антител РНИФ является основным методом диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом, широко применяется для диагностики заболеваний, передающихся половым путем.

2.8 Иммуноферментный анализ (ИФА)

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводят в два этапа: первый — взаимодействие антител с антигеном, второй — ферментативная индикация комплекса антиген — антитело за счет появления окрашивания реакционной смеси и регистрации окрашивания визуально либо спектрофотометрическим методом.

Существуют два варианта ИФА: твердофазный и жидко-фазный, различающиеся по способу разделения компонентов иммунохимической реакции. По сравнению с описанными ранее методами выявления антигенов и антител ИФА обладает существенными преимуществами:

- высокой чувствительностью, позволяющей определять до 0,05 нг/мл вещества;
- возможностью использования минимальных объемов исследуемого материала (1—2 мкл);
- возможностью инструментального или визуального учета реакции;
- экспрессностью и возможностью автоматизации всех этапов реакции.

ИФА в настоящее время широко используют в практике для диагностики многих инфекционных болезней бактериальной, грибковой этиологии, протозойных инфекций и гельминтозов, но особенно вирусных инфекций, в частности гепатитов А, В, С, D, E, G, ВИЧ-инфекции, герпесвирусных, ротавирусных, аденовирусных, астровирусных, парвовирусных и других инфекций.

2.9 Иммунный блоттинг

Принцип метода иммунного блоттинга состоит в выявлении антител к отдельным антигенам возбудителя. С помощью этого метода определяют антитела к антигенам ВИЧ (гликопротеинам оболочки вируса, белкам сердцевины и ферментам вируса). Результаты иммунного блоттинга оценивают как положительные, сомнительные и отрицательные в зависимости от количественного и качественного набора выявленных антител.

Необходимо отметить, что иммунный блоттинг уступает по чувствительности ИФА, в некоторых случаях может регистрироваться отрицательный результат при наличии ВИЧ-инфекции у пациента. Однако возможность регистрации ложноположительных результатов в ИФА при ВИЧ-инфекции требует комплексного подхода в диагностике ВИЧ-инфекции с учетом, помимо результатов иммунологических реакций (ИФА, иммунный блоттинг), эпидемиологических и клинических данных.

2.10 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Метод ПЦР был разработан американским биохимиком Кэри Мюллисом в 1983 г. на основе применения открытой им термостабильной ДНК-полимеразы (Таg-полимеразы). Принцип метода состоит в увеличении в 10⁶—10⁸ раз числа копий специфического участка ДНК возбудителя, катализируемого *in vitro* ДНК-полимеразой в автоматическом режиме.

В искусственных условиях воспроизведение процесса репликации специфического для определенного вида или рода возбудителей участка генома возможно при условии знания его

нуклеотидной последовательности. Применение методов детекции продуктов репликации таких участков (ампликонов) позволяет констатировать наличие возбудителя в исследуемой пробе. Описанное выше комплементарное достраивание цепей начинается только в определенных стартовых блоках, представляющих собой короткие двунитевые участки. При присоединении таких блоков к специфическим участкам ДНК процесс синтеза новой цепи направляется только в выбранном участке, а не по всей длине цепи ДНК. Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют две олиго-нуклеотидные затравки, которые называют праймерами. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы так, что достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними. К достоинствам метода ПЦР следует отнести:

- высокую чувствительность, позволяющую определять 10—1000 клеток в пробе;
- высокую специфичность, поскольку в исследуемом материале выявляется уникальный для данного возбудителя фрагмент ДНК;
- универсальность процедуры обнаружения различных возбудителей из одной биопробы;
- высокую скорость анализа (4—4,5 ч);
- возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций.

ПЦР эффективна для диагностики труднокультивируемых, некультивируемых и персистирующих форм микроорганизмов. Ее использование целесообразно для выявления возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов.

Применение ПЦР эффективно для диагностики широкого спектра бактериальных и вирусных инфекций.

В последнее время достаточно успешно реализуются количественные методы ПЦР-анализа, позволяющие определить концентрацию возбудителя в материале (микробную или вирусную нагрузку), например оценить репликативную активность вируса гепатита В, Си ВИЧ.

Однако следует иметь в виду, что метод ПЦР имеет и свои ограничения, в частности, для диагностики инфекций, вызванных условно-патогенной аутофлорой.

2.11 Гибридизация нуклеиновых кислот

Гибридизация нуклеиновых кислот, как и ПЦР, позволяет идентифицировать возбудителя в пробе без предварительного выделения. Для проведения анализа синтезируют одноцепочечный ДНК- или РНК-зонд, комплементарный специфическим нуклеотидным последовательностям возбудителя. Зонд метят радионуклидом, ферментом или другой легко распознаваемой меткой. Исследуемый материал подвергают обработке с целью лизиса микроорганизмов, находящихся в биопробе, выделения и денатурации ДНК. Далее проводят инкубацию зонда с исследуемым образцом и измерение количества меченой ДНК, вступившей в гибридизацию с ДНК, находящейся в исследуемой пробе. Реакция может происходить как на твердофазных сорбентах, так и в растворе, однако обязательным условием является отмывка несвязавшихся количеств меченого зонда. Чувствительность метода гибридизации нуклеиновых кислот уступает таковой ПЦР и составляет 10³ микробных клеток в пробе.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

После получения результатов обследования и с учетом эпидемиологических данных устанавливают заключительный диагноз. В диагнозе указывают нозологическую форму, шифр по МКБ-10, метод подтверждения диагноза, тяжесть и особенности течения болезни, период болезни, наличие осложнений и сопутствующих заболеваний, например: «Брюшной тиф (гемокультура), тяжелое течение болезни, период разгара; осложнение — кишечное кровотечение; сопутствующее заболевание — сахарный диабет». Максимально точно сформулированный и подробный диагноз определяет терапевтическую тактику.

В ряде случаев, когда клинических данных недостаточно, а лабораторные исследования не позволяют установить этиологию болезни, допускается постановка синдромного диагноза (например, пищевая токсикоинфекция, острое респираторное заболевание, ОРВИ).
диагностика метод инфекция заболевание