Современные методы диагностики инфекционных болезней

Методы диагностики инфекционных болезней животных

К инфекционным относят заболевания, возбудителями которых являются паразиты растительного происхождения (бактерии, бациллы, фильтрующиеся вирусы).

Для правильного определения болезни нередко требуется провести целую систему диагностических исследований (прижизненных и посмертных). Прижизненный метод включает в себя эпизоотологическое обследование хозяйства, клиническое обследование больного животного, а также лабораторное исследование материала, полученного от больного животного.

Эпизоотологическое обследование основывается на тщательном анализе эпизоотологической обстановки хозяйства или района. При этом учитывают статистические и отчетные данные, характеризующие ветеринарное состояние хозяйства за предыдущие годы, проводят обследование санитарного и зоогигиенического состояния хозяйства и животноводческих ферм с учетом условий содержания животных, качество ухода за ними, кормления, происхождения кормов, их качества и режима использования, качества воды и порядка водопоя. Определяют количество больных и восприимчивых к заболеванию животных. Устанавливают возможные источники и пути распространения инфекции в хозяйстве и разрешают ряд других вопросов.

Иммунологическая диагностика инфекционных заболеваний основана на выявлении антител в организме пациента к возбудителю инфекции методами серологических исследований. В основе всех серологических реакций лежит взаимодействие антигена и антитела с образованием иммунных комплексов, которые можно обнаружить в тестах in vitro.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

В методах иммуноферментного анализа используют иммунореагенты, меченные ферментами. Наиболее широко используется твердофазный ИФА. В качестве твердой фазы используют полистироловые или поливиниловые планшеты или шарики, на которых адсорбированы антигены или антитела. Для выявления антител известный антиген адсорбируют в лунках полистироловой пластины. Затем вносят исследуемую сыворотку, в которой хотят обнаружить антитела к данному антигену.

После инкубации лунки промывают для удаления несвязавшихся белков и вносят в них антииммуноглобулиновые антитела, меченые ферментом. После инкубации и отмывания в лунки добавляют специфичный для фермента субстрат и хромоген для регистрации конечных продуктов расщепления субстрата. О наличии и количестве антител судят по изменению цвета и интенсивности окраски раствора. Методы ИФА обладают высокой чувствительностью и специфичностью и получили наиболее широкое распространение среди иммунологических методов клинико-лабораторной диагностики.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР - это метод умножения числа копий нуклеиновых кислот (амплификация) in vitro. Перед проведением реакции из биологического материала выделяют ДНК или РНК возбудителя инфекционного заболевания или ДНК генома клеток человека или животного. Полимеразная цепная реакция проводится с использованием двух или более олигонуклеотидных праймеров («затравки»), фланкирующих участок ДНК (РНК), специфический для определяемого участка генома. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой. Праймеры ориентированы таким образом, что синтез с помощью полимеразы протекает только между ними, удваивая количество копий этого участка ДНК в каждом последующем цикле.

Как правило, проводится не менее 30 последовательных циклов реакции. Амплифицированный учасок именуют «ампликоном». В результате реакции происходит экспоненциальное увеличение количества копий специфического фрагмента. При амплификации используется термостабильная ДНК-полимераза, выделенная из бактерий Thermus aquaticus (Taq), живущих в горячих источниках.

Диагностика инфекций, вызываемых стафилококками

Стафилококк является одним из наиболее часто встречающихся микробов. У человека стафилококк чаще всего вызывает гнойные заболевания и осложнения при соматических и хирургических заболеваниях. Ведущее место в диагностике заболеваний, вызываемых стафилококком отводится бактериологическим методам. Серологическая диагностика направлена на выявление титра антител в сыворотке больного.

Диагностическим считается нарастание титра антител через 7-10 суток при исследовании парных сывороток. Однократное исследование диагностического значения не имеет, так как практически у 100% взрослых особей в сыворотке определяются антитела к стафилококкам.

Диагностика инфекций, вызываемых пневмококками

Пневмококк (Streptococcus pneumoniae) чаще всего встречается как возбудитель пневмонии, у маленьких детей он может вызывать менингит, а у взрослых изредка вызывает сепсис. Лабораторная диагнос-тика пневмококковых инфекций складывается, в основном, из бактериоскопического и бактериологического исследований, серологическая диагностика играет вспомогательную роль. Серологическая диагностика направлена на выявление титра антикапсулярных антител в сыворотке больного. Диагностическим считается нарастание титра антител через 7-10 суток при исследовании парных сывороток.

Диагностика сальмонелезной инфекции

Описано более 2200 серологических вариантов сальмонелл, из них у человека более 700. Наиболее часто встречаются следующие сальмонеллы: S.typhimurium, S.heidelberg, S.enteritidis, S.anatum, S.derby, S.london, S.panama, S.newport. Ежегодно 20-35% изолятов приходится на S.typhimurium (Пак С.Г. с соавт., 1988).

Антигенная структура сальмонелл сложна. Она содержит О- и Н-антигены. О-антиген связан с соматической субстанцией клетки, термостабилен, одним из его компонентов является Vi-антиген; Н-антиген обладает жгутиковым аппаратом, термолабилен. Различия в строении О-антигенов позволили выделить серологические группы сальмонелл: А,В,С,D,Е и др. На основании различий в строении Н-антигенов внутри каждой группы установлены серологические варианты. В лабораторной диагностике сальмонеллезной инфекции испольуются бактериологические и серологические методы диагностики. Среди серологических методов диагностики до последнего времени широко применялась реакция Видаля, которая в последние годы постепенно утрачивает свое значение. В настоящее время для выявления антител к сальмонеллам наиболее широко используются РПГА и иммуноферментный метод, которые более чувствительны и дают положительные результаты с 5-го дня заболевания (реакция Видаля на 7-8 день). Антитела у больных брюшным тифом, паратифом или другими серологическими типами сальмонелл появляются в крови уже к 4-му дню болезни и резко нарастают к 8-10-му дню. Количество их еще более увеличивается на 2-3-й неделе заболевания (Пак С.Г. с соавт., 1988). В первые месяцы после выздоровления исследование на антитела к сальмонеллам может служить и для целей ретроспективного диагноза.

Необходимо, однако, учитывать индивидуальные отклонения от нормального цикла иммуногенеза и изложенной динамики изменения титра антител. В ослабленном организме со сниженной реактивностью слабо и медленно вырабатываются антитела. Интеркурентные заболевания также могут задержать их формирование. Таким образом, титр антител менее 1:200 не позволяет исключить заболевание, поэтому чрезвычайно важно исследовать титр антител в динамике в начале заболевания и через 10-14 суток. Нарастание титра антител через 10-14 суток не менее чем в 4 раза при исследовании парных сывороток свидетельствует об инфекционном процессе. На основании антигенной структуры, присущей различным видам сальмонелл, разработаны О- и Н-монодиагностикумы, которые позволяют установить серологический вариант сальмонелл. Первоначально исследуется сыворотка в РПГА с комплексным препаратом диагностикума эритроцитарного сальмонелезного-О. Далее, при наличии агглютинации с комплексным диагностикумом, РПГА ставят с препаратами групп А (1,2,12), В (1,4,12), С1 (6,7), С2 (6,8), Д (1,9,12) и Е (3,10).

Диагностика бруцеллеза

Возбудитель бруцеллеза - бруцеллы - мелкие неподвижные грамотрицательные бактерии. При постановке диагноза бруцеллеза полученные клинико-эпидемиологические данные должны быть подтверждены лабораторно. С этой целью используются бактериологический, биологический и серологический методы исследования.

Реакция Хеддельсона на стекле используется для полуколичественного определения антител к возбудителю бруцеллеза и является ориентировочным тестом. Самым надежным серологическим тестом определения антител к возбудителю бруцеллеза в сыворотке является реакция агглютинации Райта, посредством которой определяют уровень антител, реагирующих, главным образом, с липополисахаридными антигенами бруцелл. Увеличение титров антител в 4 и более раз в пробах сыворотки крови, полученных с интервалом 1-4 недели, позволяет идентифицировать этиологический фактор заболевания. У большинства больных повышение титров специфических антител отмечается на 3-5-й день от начала заболевания, а на 3-й неделе фактически у всех происходит сероконверсия. Достоверным считается титр антител не менее 1:200 с последующим его нарастанием. Причиной ложноположительных результатов может служить проведение кожной пробы на бруцеллез, вакцинация против холеры, а также инфекции, вызванные холерным вибрионом, иерсиниями.

Агглютинирующие антитела IgG можно определить в реакции агглютинации путем экстрагирования с 2-меркаптоэтанолом. Антитела IgG появляются на 2-3-й неделе от начала заболевания, титры их достигают максимума примерно через 8 недель и сохраняются весь период активной инфекции, благодаря чему они свидетельствуют о продолжающемся активном инфекционном процессе. На фоне проводимого лечения титры антител IgG быстро снижаются и в течение года приближаются к нулю. В случае рецидивов уровень антител IgG снова повышается. Наличие однократного повышения титра антител IgG > 1 : 160 является надежным объективным указанием на текущую или недавно имевшую место инфекцию и необходимость проведения лечения. После проведенного лечения и выписки больного из стационара рекомендуется проведение серологических исследований в течение первого года через 1,2,3,6,9,12 месяцев, а в течение второго года - ежеквартально.

В практике диагностики бруцеллеза широкое применение нашли серологические методы исследования и аллергическая внутрикожная проба. Серологические методы включают реакции Хеддельсона, Райта, Кумбса, связывания комплемента (РСК), пассивной или непрямой гемагглютинации (РПГА), реакция иммуноферментного анализа (РИФА), иммунофлюоресценции.

Наиболее чувствительными являются реакции Хеддельсона, РПГА и РИФА. Положительными они бывают с первых дней заболевания и сохраняются в значительном числе случаев более года. Реакция Райта высокоспецифична, появляется в первую неделю после заболевания, но концентрация антител колеблется в широких пределах и в ближайшие месяцы после заболевания они могут полностью исчезнуть. Особенно нестабильны показатели серологической реакции Райта у животных и людей, в прошлом привитых. В этих случаях применяют комплекс иммунологических реакций, в том числе и внутрикожную аллергическую пробу. Последняя высокоспецифична, становится хорошо выраженной к концу первого месяца после клинического проявления болезни.

Выраженность различных иммунологических реакций, их сочетание и степень корреляции с тяжестью проявления и прогноза развития болезни сугубо индивидуальны. Поэтому по ним нельзя судить ни о полноценности формирующегося иммунитета, ни о прогнозе процесса. При наличии выраженных иммунологических реакций на бруцеллез можно лишь ориентировочно судить об активности и тяжести процесса, а главное - подтвердить этиологию заболевания.

В связи с широким использованием специфической профилактики бруцеллеза среди животных и людей возникла проблема дифференциации поствакцинальных и постинфекционных реакций, диагностическая ценность которых в связи с этим значительно снизилась. Поэтому для окончательной постановки диагноза данные серологического и аллергического исследований должны дополняться сведениями о клинических особенностях проявления болезни. Постановка диагноза «бруцеллез» нередко сопряжена с огромными трудностями и здесь особую важность приобретают не только данные лабораторного и клинического исследований, но и эпидемиологического анамнеза.

Ввиду того что различные виды бруцелл по патогенности для человека не идентичны, а способность бруцелл к поражению тех или иных органов и тканей отличается строгой индивидуальностью и зависит от исходной реактивности заразившегося организма, клиника бруцеллеза по характеру своего проявления отличается широким многообразием.

В фазе генерализации клинические проявления бруцеллеза полиморфны. Больные жалуются на летучие боли в суставах, мышцах, пояснице, озноб, пот, слабость, реже - на головную боль и потерю аппетита. Уже с первых дней болезни могут появляться в различных сочетаниях такие симптомы, как головная боль, бессонница, раздражительность, эйфория, подавленность. У 10% больных эйфории не отмечается и общее состояние напоминает брюшнотифозное. Наличие тифозного статуса и пятнисто-розеолезного или пятнисто-петехиального высыпания затрудняет дифференциальный диагноз с брюшным тифом. В подобных случаях решающим подспорьем должны служить иммунологические реакции (РА, РПГА и РИФА), получение гемокультуры и эпидемиологический анамнез.

В фазе генерализации с очаговыми поражениями превалируют субфсбрильная или высокая температура (в зависимости от тяжести заболевания), летучие боли в суставах, профузный ночной пот, головная боль, полимикроаденит, увеличение печени, потеря аппетита, приглушенные тоны сердца. Все больные жалуются на постоянные боли в местах очаговых поражений. Наиболее часто при бруцеллезе поражается локомоторный аппарат (80%) и нервная система (64%), но могут поражаться любые органы и системы человеческого организма.

В фазе очаговых поражений наиболее часто встречаются воспалительные изменения в нервной системе. Со стороны локомоторного аппарата наиболее часто наблюдаются синовиты, бурситы, артриты, параартриты, периоститы, тендовагиниты, миозиты. Поражения различных органов и систем в большинстве случаев встречаются не изолированно, а в разных сочетаниях, причем чаще в процесс вовлекаются нервная система и локомоторный аппарат.

Для бруцеллезных больных характерно наличие лейкопении и относительного лимфоцитоза. Количество эозинофилов у большинства больных понижается. СОЭ чаще нормальная или ускоренная.

У больных с остаточными явлениями бруцеллеза на первый план выступают симптомокомплексы, обусловленные дисфункцией вегетативного отдела нервной системы и аллергическими поражениями сосудов: артралгии, миалгии, головная боль, субфебрильная температура, потливость, инъецированность сосудов склер, прогрессируют миокардиодистрофия и миокардиосклероз. Для описываемого периода характерны неврастенические симптомы: раздражительность, астенизация психики при общем депрессивном фоне, эмоциональная лабильность, быстрая утомляемость и др.

У больных, получивших специфическое лечение в предыдущих фазах бруцеллеза, как правило, наблюдались более легкие резидуальные явления, чем у лиц, не получавших периодического лечения.

Список литературы

инфекционная болезнь иммуноферментный бруцеллез

Бурделев Т.Е., Жильцов В.Г. - Практикум по ветеринарии - М.,1965.

Внутренние незаразные болезни сельскохозяйственных животных - М., 1972.

Ветеринарно-санитарные нормы по безопасности кормов и кормовых добавок: : №48: утв. М-вом сельского хозяйства и продовольствия РБ от 28.04.08: ввод. в действие 28.04.08.

Европейская информационная сеть по микотоксикологии. - <http://www.mycotoxins.org>

Постановление Комиссии ЕС № 466/2001 от 8 марта 2001 года «Устанавливающая максимально допустимые уровни определенных контаминантов в продуктах питания». - OJ L 77, 16.3.2001. - p. 1.

Анина-Радченко Н.Д. - Дисс.докт.мед.наук, 1954.

Вершилова ПА., Чернышева М.И., Князева М.И.- Патогенез и иммунология бруцеллеза, Москва, Медицина, 1974.