**Владивостокский Государственный Медицинский Университет**

***Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии***

**РЕФЕРАТ**

**Экспресс-**

**Диагностика**

**Особо Опасных**

**Инфекций**

**Выполнил: Новак А.Л.**

**301 гр., л/ф**

**Владивосток, 1998.**

**Содержание**

**1.    Актуальность проблемы……………………………………….3**

**2.    Общие принципы экспресс-диагностики состояний инфекции и иммунитета………………………….4**

**3.    Экспресс-диагностика холеры……………………………….11**

**4.    Экспресс-диагностика туляремии…………………………..15**

**5.    Экспресс-диагностика чумы…………………………………17**

**6.    Некоторые другие методы……………………………………19**

**7.    Заключение……………………………………………………..22**

**8.    Список использованной литературы……………………….23**

**Актуальность проблемы**

***Особо опасные инфекции (ООИ)*** – это инфекции, которые могут возникать среди населения в виде отдельных заболеваний, эпидемий и даже пандемий, чаще сопровождая ЧС (стихийные бедствия, войны, массовый голод и т.п.), характеризующиеся природной очаговостью, быстрым распространением и тяжелым течением.

Единого во всем мире мнения о том, какие инфекции следует причислять к ООИ пока нет, отечественные эпидемиологи придерживаются такого перечня:

1.     Чума

2.     Туляремия

3.     Миелоидоз

4.     Геморрагические лихорадки

5.     Желтая лихорадка

6.     Холера

7.     Генерализованная форма сибирской язвы

Наиболее вероятное появление ООИ возможно во время ЧС. Резкое ухудшение санитарно-гигиенических условий обостряет эпидемическую ситуацию по инфекциям, которые раннее имели эндемических характер, а завезение инфекции извне прибывающими лицами приводит к тому, что потенциальные источники инфекции оказываются неизолированными и в течение длительного времени имеют многочисленные контакты с окружающими их лицами. В связи с этим до установления окончательного диагноза заболевания соблюдается строгий противоэпидемический режим. При первых признаках или подозрении на ООИ осуществляется:

*         Выявление контактных лиц и их обсервация;
*         Дача антибиотиков широкого спектра действия (доксицилин, тетрациклин и др.), т.е. экстренная профилактика;
*         Проведение дезинфекционных мероприятий;
*         Отбор материала от больных и доставка его в лабораторию для микробиологического исследования;
*         Организация частичной (полной) санобработки конкретных лиц.

В данной работе разбирается этап диагностики ООИ на примере чумы, холеры и туляремии. Если диагноз установлен с достаточной достоверностью, можно определить характер противоэпидемических мероприятий, установить возможный источник инфекции и механизмы его передачи. Именно по этому необходимо и оправдано применение экспресс-методов диагностики ООИ.

**Общие принципы экспресс-диагностики состояний инфекции и иммунитета**

Современная иммунология исключительно многолика, а сферы применения иммунологических знаний и методов беспредельно раз­нообразны. Они используются практически во всех разделах био­логии, ветеринарии и медицины — от фундаментальных молекулярно-биологических исследовании до медико-генетического кон­сультирования и множества других сугубо практических процедур, осуществляемых растениеводами, животноводами и медиками.

И, тем не менее, особенно важным в социальном отношении и методически наиболее передовым продолжает быть тот старей­ший и неуклонно развивающейся раздел иммунологии, успехами которого обеспечивается развитие теории и осуществление прак­тики противоэпидемической работы—диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний. А методы иммунологической экспресс-диагностики имеют ключевое значение для эффек­тивного решения названных проблем и осуществления всех соот­ветствующих противоэпидемических мероприятий. Следующие ниже материалы и посвящены именно этому разделу прикладной иммунологии, его состоянию и перспективам развития.

Важнейшей предпосылкой эффективности любых противоэпи­демических мероприятий является своевременное прогнозирование и обнаружение моментов активизации тех экологических и соци­ально-экологических взаимодействий, которые составляют суще­ство эпидемических процессов. Исключительное разнообразие, свойственное последним и требующее дифференциации противо­эпидемических мероприятий, обусловлено не только самобыт­ностью каждой из существующего множества инфекционных бо­лезней. Очень большое значение имеет в этом отношении фунда­ментальное явление гетерогенности популяций, входящих в состав соответствующих экологических и социально-экологиче­ских систем микроб—жертва. Вариабильность этих весьма сложных биосоциальных факторов и условий в очень большой мере влияет на специфику того или иного этапа существования каждого эпидемического процесса. И своевременное распознавание этих особенностей, осуществляемое, как правило, с использованием иммунологических методов, обеспечивает ту дифференциацию проти­воэпидемических мероприятий, благодаря которой достигается надлежащее сочетание их эффективности и оправданности.

Активизация эпидемических процессов определяется, прежде всего, изменением соотношений между двумя основными парамет­рами экологических систем микроб—жертва, а 'именно между бо­лезнетворными потенциями возбудителей соответствующих инфек­ций и иммунологическим статусом угрожаемых контингентов в це­лом и каждого из их членов в отдельности. Соотношения между этими параметрами определяют сроки и интенсивность активиза­ции эпидемических процессов, а следовательно объем и характер противоэпидемических мероприятий. Состояние же этих парамет­ров и соотношения между ними характеризуются главным обра­зом с помощью иммуно-диагностических методов, позволяющих оценивать состояния инфицированности и иммунности, как индиви­дуумов, так и коллективов. Вполне понятно, что наибольшую цен­ность имеют экспрессные методы иммунодиагностики.

Иммунологические методы экспресс-диагностики состояний ин­фекции и иммунитета в некоторых отношениях принципиально раз­личны, но во многих других аспектах они являются практически едиными.

Методы экспресс-диагностики инфекционных заболеваний до недавнего времени развивались главным образом на основе клас­сических схем микробиологического анализа, который сводится к выделению в чистой культуре возбудителя и последующей его идентификации по биохимическим, тинкториальным, антигенным и другим характерным свойствам. Многоэтапность этих анализов обусловливает их длительность и практически исключает экспрессность, удовлетворяющую эпидемиологическую и клиническую практику. Длительность микробиологического анализа составляет, как минимум, несколько дней.

Экспресс-индикация — это своеобразная раз­ведка большой армии лабораторной диагностики. Она на­ходится на переднем крае научного поиска новых, простых, экономичных, быстрых методов индикации микробов, часть из которых в дальнейшем идет на вооружение лаборатор­ной практики и благодаря этому последняя все время со­вершенствуется.

Основные объективные требования к экспрессным методам диагностики инфекционных заболеваний сводятся к следующему:

1. получение результатов анализа в максимально короткие сроки (часы, идеально—минуты);

2. возможность проведения и завершения анализа без выделе­ния искомого микроорганизма в чистой культуре, при использо­вании только нативного материала, в крайнем случае—с привле­чением элективных биосред для быстрого накопления возбуди­телей;

3. бесспорно высокая специфичность и высокая чувствитель­ность, как предпосылки надлежащей достоверности анализа;

4. высокая производительность, простота, доступность и воспроизводимость анализов. Эти требования в равной мере приложимы и к методам экспрессной диагностики состояний иммуни­тета.

Предпочтительность использования того или иного из суще­ствующих методов экспресс-диагностики зависит от многих кон­кретных условий. Однако наиболее желательным является парал­лельное использование 2—3 методов. Такой подход значительно увеличивает надежность получаемого результата.

На ближайшие годы наибо­лее перспективными следующие направления развития экспресс-индикации микроорганизмов.

1. **Энзимоиндикационное направление**, связанное с экспресс-индика­цией биохимических свойств и определением ферментатив­ного спектра микробов.

По-прежнему сохранят свою значимость исследования по разработке политропных (полисубстратных) питатель­ных сред. В нашей стране были разработаны оригинальные политропные среды и их комбинации, кото­рые с успехом применяются в лабораторной практике.

При создании сложных поликомпонентных питательных систем необходимо исходить из различных биохимических и энергетических потребностей микроорганизмов. Для луч­шего проявления жизнедеятельности и биохимической ак­тивности патогенных и других микробов в средах необхо­димо создавать оптимальные условия для их роста и раз­множения и одновременно вводить ферментируемые суб­страты (углеводы, многоатомные спирты, аминокислоты и др.) с наиболее чувствительными индикаторами, которые быстро бы регистрировали их ферментацию. В результате применения оптимальных полисубстратных сред произво­дится выделение и накопление чистой культуры микробов с одновременным определением их биохимических призна­ков.

Перспективным следует рассматривать развитие энзимоиндикационных методов, в которых субстрат с инди­катором отделен от питательной среды и фиксирован на специальном носителе. В нашей стране разработаны углеводно-бумажные дис­ки с защитной пленкой (бумажные реагенты для определе­ния дезаминаз у микробов) и их аналоги БИС (бу­мажно-индикаторные системы), углеводно-бумажные поплавки, углеводно-полимерные пленки . Все эти препараты являются весьма перспективными, они поз­воляют в течение кратчайшего срока (3—5 ч), используя общепринятые питательные среды и лабораторную посуду, определять ферментативную активность различных видов микроорганизмов.

Автономный препарат — карандаш-фермент, не имею­щий аналогов ни у нас, ни за рубежом, позволяет без при­менения питательных сред непосредственно на предметном стекле определять биохимические свойства микробов.

Полисубстратная тест-система и энзимоиндикаторная лента используются для одновременной идентификации 20 биохимических признаков у микробов. Это новые виды простых «долгоживущих» препаратов, предназначенных для быстрого и экономичного определения биохимических свойств микробов.

Электрофизический метод определения ферментатив­ной активности микробов включает посев микробной культуры на жидкие питательные среды, содержащие пептонную воду, различные углеводы, многоатомные спирты, аминокислоты с последующим ферментативным расщепле­нием исследуемых веществ и образованием различных ио­низированных продуктов распада, обнаруживаемых спе­циальной электронной аппаратурой. Результаты энзимо­индикации регистрируются через 45—60 мин с момента посева материала. Метод позволяет обнаружить и иденти­фицировать конечные продукты распада, то есть конечные мотаболиты с определением их биохимической и химичес­кой природы. Безусловно, электрофизический метод заслу­живает пристального внимания и нуждается в дальнейшем изучении и доработке.

2. **Иммунологическое направление**, связанное с быстрым определением как отдельных специфических детерминант, так и с индикацией целых антигенных групп и комплексов, характеризующих роды, виды и серовары бактерий. К соб­ственно иммунологическому направлению мы относим классические иммунологические методы, основанные на использовании естественных реагентов. Реакции преципи­тации в жидкости по Асколи и в геле по Оухтерлоню и Манчини (особенно их микроварианты) сохраняют свое значение как методы экспресс-индикации патогенных микробов и выявления их антигенов в различных материа­лах.

Перспективными являются рапид-системы для одновре­менной и быстрой индикации различных видов микроорга­низмов в реакциях микроагглютинации, хотя по-прежнему не решены вопросы создания оптимальных видов и наибо­лее экономичных форм таких систем. Иммунологические принципы распознавания антигенов являются весьма тон­кими, специфическими, чувствительными, с большими ин­дикационно-диагностическими возможностями. Комплексирование иммунологических принципов с физическими, хи­мическими и некоторыми другими принципами способство­вало дифференциации иммунологического направления на ряд самостоятельных направлений, которые приводятся ниже.

3. **Иммунофизическое направление**, использующее раз­личные по природе, форме и величине виды мелкодисперсных носителей (сорбентов) антигенов и антител, способ­ствующих повышению чувствительности комплексных им­мунологических методов.

Реакции пассивной гемагглютинации и их модифи­кации связаны с использованием эритроцитарных диагно­стических препаратов. Эритроцитарную диагностику с успехом применяются для ускоренного обнаружения и идентификации как патогенных, так и условно-патоген­ных микроорганизмов (например, возбудителей туляремии, бруцеллеза, сальмонеллеза и др.) в различных патоло­гических материалах, получаемых от больных, и в объек­тах внешней среды. Реакции с эритроцитарными диагностикумами являются весьма чувствительными, и в этом отношении часто превосходят другие серологические реак­ции. Они введены в официальные инструкции по экспресс-индикации бактериальных агентов в элементах внешней среды и в материалах, полученных от пораженных людей и животных.

Одновременно продолжаются поиски новых носителей антигенов и антител, которые были бы безантигенными, стабильными, не разрушающимися при длительном хране­нии, а применяемые реакции — простыми по технике по­становки (например, стекольные тесты) и исследования с их помощью — экономичными.

Совершенствуются реакции с применением цветных целлюлозных частиц в качестве носителей антигенов и ан­тител. Положительными свойствами такого рода пре­паратов являются: 1) отсутствие собственной антигенности; 2) стабильность при длительном хранении; 3) демонстративность и простота техники постановки реакции, обычно на предметном стекле; 4) высокая скорость про­хождения реакции; 5) экономичность.

Кроме того, полезным и оправданным считаем поиск новых носителей антигенов и антител. В этом отношении перспективными являются ионообменные смолы, латексы, целлюлоза и ее производные и ряд других веществ, кото­рые могут способствовать повышению чувствительности серологических реакций.

4. **Иммунохимическое направление**, связанное с использованием разнообразных комплексных соединений специ­фических антител или антигенов с химическими вещества­ми. Присоединенные химические вещества придают им но­вые феноменологические способности и свойства, тем са­мым, расширяя возможности экспресс-индикации микроб­ных агентов в частности и лабораторного анализа вообще.

Большую популярность и практическую значимость приобрели методы быстрого иммунофлуоресцентного ана­лиза (прямой, непрямой, антикомплементарный), которые ныне официально используются как методы экспрессной индикации и быстрого определения микроорганизмов.

Дальнейшее развитие весьма перспективного иммунохимического направления во многом зависит от химиков, которые должны разработать достаточно яркие новые красители, вступающие в соединения со специфическими антителами и антигенами. В результате могут быть полу­чены препараты с новыми феноменологическими свойства­ми, позволяющими проводить экспресс-индикацию микроб­ных культур и отдельных клеток с помощью широко рас­пространенных микроскопических устройств (типа МБИ различных марок).

5. **Иммуноферментное направление**, интенсивно разви­вающееся в последние годы. Разработаны прямой, непря­мой, антикомплементарный и другие методы быстрого об­наружения микробов путем использования иммуноэнзимологического принципа; предложены новые виды фермен­тов, а также разнообразные виды хромогенных субстратов. Данное направление является весьма перспективным, раз­витие его может привести в ближайшие годы к появлению новых методов экспресс-индикации микроорганизмов.

6. **Иммуноэлектрофоретическое направление** успешно развивается с конца 50-х годов. Разработаны многочис­ленные методы иммуноэлектрофореза. Однако для целей экспресс-индикации микробов чаще прибегают к встречно­му иммуноэлектрофорезу. Применение новых химических красителей, ферментной или радиоактивной метки позво­лит резко повысить чувствительность метода иммуноэлектропреципитации.

7**. Иммунорадиологическое направление** связано с ис­пользованием разнообразных конъюгатов специфических антител или антигенов, соединенных с радиоактивными ве­ществами, которые придают им новые феноменологические свойства и способности, расширяя возможности экспресс-индикационного метода. Весьма перспективно дальнейшее развитие иммунорадиологического направления, так как оно несомненно приведет к созданию новых, простых ме­тодов экспресс-индикации микроорганизмов.

8. **Микроцитологическое направление** быстрого цитоморфо-логического анализа связано с использованием светлопольной, фазово-контрастной или люминесцентной ми­кроскопии бактериологических мазковых препаратов, обра­ботанных и окрашенных красителями, позволяющими бы­стро идентифицировать микроорганизмы по их морфоло­гии и специфическим структурным элементам микробной клетки. Исследованию подвергают как нативный (гной, мокрота, моча, СМЖ, различные экссудаты и др.), так и обогащенный (например, центрифугированием, фильтрова­нием и другими методами) патологический материал.

9. **Бактериологическое направление** связано с ускорен­ным выделением и накоплением бактериальных популяций патогенных, условно-патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов. Оно основано на использовании оп­тимальных ростовых питательных сред, содержащих необ­ходимые биостимуляторы, для ускоренного получения бак­териальной культуры и частичной их идентификации по совокупности культуральных признаков.

10. **Фагодиагностическое направление**, которое преду­сматривает, с одной стороны, идентификацию микробов с помощью специфических индикаторных бактериофагов, а с другой,— обнаружение и индикацию специфических фагов в патологическом и другом материалах с помощью инди­каторных микробных культур.

Ускоренная фагодиагностика в ряде случаев является необходимым и полезным методом, позволяющим значи­тельно сократить сроки исследований и установить природу возбудителя даже в тех случаях, когда другими методами, в виду его изменчивости или загрязненности материала, он остается нераспознанным.

11. **Биологическое направление**, связанное с изучением токсических и агрессивных свойств патогенных микроорга­низмов. Биологические методы осуществляются на одно­клеточных организмах, на культурах клеток, куриных эм­брионах, а также на здоровых, а еще лучше специально подготовленных лабораторных животных. Эти методы бо­лее трудоемкие и менее точные по сравнению с другими.

12. **Физико-химическое направление**. Это направление связано с использованием сравнительно быстрых, но в то же время и достаточно сложных по аппаратурному оформ­лению методов. Сюда входят методы изучения бактериаль­ных популяций и их экстрактов с помощью хроматографии (газожидкостная и др.), спектроскопии (инфракрасной, ультрафиолетовой и др.), резистографии в отношении раз­личных антибиотических, химических и лекарственных ве­ществ, а также методы температурной и кислотной агре­гации, коагуляции микробных суспензий и их токсинов.

13. **Рецепторное и генетическое направления** бы­строй индикации патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов. Методы, основанные на этих принципах, только начинают развиваться. Так, с помощью целлюлозно-глобулинового или эритроцитарно-глобулинового диагностикумов быстро обнаруживают патогенный стафило­кокк, содержащий белок А, а путем гомологии неизвестных нуклеиновых кислот с известными нуклеиновыми кислота­ми устанавливают вид патогена.

14. **Комплексное направление** ускоренной идентифика­ции патогенных и санитарно-показательных микроорганиз­мов, использующее методы экспресс-индикации, основан­ные на интеграции различных принципов, связано с разра­боткой и созданием индикаторных тест-систем, позволяю­щих в течение короткого срока и с минимальными затра­тами на анализ определить комплекс основных признаков патогена или санитарно-показательного представителя, достаточных для его идентификации до рода, вида и даже типа.

15. **Направления, связанные с разработкой новых прин­ципов микробиологического анализа**. Вполне вероятно, и мы вправе ожидать в ближайшие 5—10 лет появления но­вых идей, подходов и принципов в микробиологической нау­ке и смежных с ней областях. Открытие новых видов рецепторной, иммунологической и генетической специфично­сти у микробов позволит создать новые и возможно более совершенные методы быстрой идентификации микроорга­низмов.

Основные пути развития экспресс-индикации микро­организмов на ближайшие годы:

1) создание и конструирование новых препаратов, спо­собствующих ускорению и удешевлению исследований, по­вышению эффективности лабораторной диагностики ин­фекций и индикации патогенных и других микроорганиз­мов. На этом пути предстоит сделать очень многое, по­скольку общепринятые диагностические препараты в зна­чительной степени исчерпали свои потенциальные возмож­ности;

2) разработка новых более чувствительных, простых методов лабораторного анализа.

3) разработка комплексных методов и видов исследо­ваний. Будет продолжаться дальнейшая интеграция мето­дов и видов исследований, имеющих разные принципы дей­ствия, лежащие в их основе;

4) создание новых схем исследований. Поскольку ла­бораторная диагностика инфекционных болезней, а также экспресс-индикация, хотя и в меньшей степени, связаны с изучением комплекса различных свойств и особенностей микроорганизмов с использованием обычно разнообразных методов и приемов, основанных на различных принципах, то создание новых схем исследований с применением но­вых методов является объективной реальностью и важной задачей, вытекающей из существа самого процесса разви­тия микробиологического анализа;

5) разработка и создание новых методов регистрации и учета результатов экспресс-индикационных и лаборатор­ных исследований.

6) разработка новой микроминиатюрной лабораторной посуды, аппаратуры и приборов для исследований;

7) автоматизация и компьютеризация исследований.

В современных условиях эти вопросы должны решаться комплексно.

Таким образом, рассмотренные основные направления и пути развития экспресс-индикации микроорганизмов в период современного научно-технического прогресса есте­ственных наук безусловно получат дальнейшее ускоренное развитие, а микробиологическая лабораторная практика обогатится новыми быстрыми методами индикации микро­бов.

**Экспресс-диагностика холеры**

Холеру вызывают два биовара Vibrio cholerae. Один из них, выделенный Кохом в Египте в 1883 году, назвали классическим, другой, полученный Ф.Готшлихом на карантинной станции Эль-Тор в Северной Африке в 1906 году – V.eltor. оба биовара неагглютинирующиеся вибрионы (НАГи), галофильные парагемолитические вибрионы, продуцирующие гемолизин, и нехолерные вибрионы-кислотообразователи включены в род Vibrio семейства Vibrionaceae.

Это острая кишечная инфекция, сопровождающаяся резким обезвоживанием и обессоливанием организма. Источником инфекции является человек – больной или носитель. Механизм передачи фекально-оральный.

Возбудители имеютсоматический О- и жгутиковый Н-антигены. О-антиген обладает видовой и типовой специфичностью. По строению О-антигена различают долее 40 сероваров. Развивающийся к холере иммунитет носит гуморальный характер.

Материал для исследования: испражнения, рвотные массы, трупный материал.

***Метод массового исследования на вибриононосительство.*** Материал берется непосредственно из кишечника при помощи стеклянной трубочки диаметром 0,5 см (для детей), 1,5 см (для взрослых) и длиной 15 см с оплавленными концами (при отсутствии трубочек используют ватные тампоны на деревянных палочках). Трубочку немедленно погружают во флакон, содержащий 100 – 200 мл 1% пептонной воды и агглютинирующую холерную О-сыворотку в разведении до половины ее титра. В один и тот же флакон берут материал от 10 лиц. Флаконы помещают в термостат при 370С. Через 3 – 4 часа холерные вибрионы начинают агглютинироваться и постепенно (в течение ближайших 2 часов) падают в виде хлопьев на дно флакона. Исследуя под микроскопом окрашенные мазки и «висячую каплю», обнаруживают склеившихся и частично свободных вибрионов. Через 6 часов дается ответ и в случае обнаружения холерных вибрионов немедленно производится посев индивидуально от каждого из 10 лиц. Такой метод дает возможность исследовать до 16 000 человек за 3 – 4 дня.

***Метод иммунодиагностической микропленки.*** Изучение антигенных свойств холерных вибрионов проводят путем постановки пробирочной или пластинчатой реакции агглютинации с использованием сухих лиофилизированных диагностических агглютинирующих холерных 0-сывороток и сывороток Огава и Инаба. Сыворотку раз­водят в физиологическом растворе или дистиллированной воде и смешивают при постановке агглютинации на стекле с исследуемой культурой вибрионов. При подготовке сы­воротки используется дополнительная посуда, что услож­няет работу бактериолога, а в оставшейся разведенной сы­воротке быстро прорастает бактериальная микрофлора и инактивирует ее.

Для изучения антигенной структуры холерных вибрио­нов были разработан иммунодиагностический препарат в виде микропленок разового применения, который обладал достаточной специфичностью, демонстративностью и экономичностью. Иммунодиагностические холерные микропленки (ИХМП) в виде полимерной плен­ки с нанесенными высушенными каплями, фиксированны­ми на бумаге, содержат минимальное количество сыворот­ки, пленкообразующий компонент и консервант. Пленко­образующий компонент связывает, склеивает и фиксирует микроколичества ингредиентов к поверхности носителя, исключает крошение микропленок; консервант предохраня­ет препарат от разрушения при длительном хранении.

Концентрация диагностической сыворотки в ИХМП яв­ляется достаточной, поскольку после эмульгирования в капле физраствора, антитела содержатся в титре 1:100, что полностью обеспечивает ход реакции. Тем самым обеспечивается достаточная концентрация антител, снижается, расход диагностической сыворотки и исключается возможность ее неиспользования. При этом создаются условия для быстрого растворения ИХМП, контакта ее с холерными вибрионами и проведения реакции непосредственно на по­лимерной пленке.

Готовые ИХМП хранят в темном сухом месте при 4— 7°С в картонных коробках (срок годности 3 года — срок наблюдения) и по мере надобности ИХМП используют для определения холерных вибрионов. Для исключения случай­ного заражения окружающих предметов ИХМП помеща­ют в чистую чашку Петри. На поверхность ИХМП наносят каплю физиологического раствора, в которой растворяют ее. Разведенную сыворотку смешивают с изучаемой куль­турой вибрионов, снятой бактериологической петлей с пи­тательной среды. При другом варианте постановки реак­ции ИХМП снимают скальпелем с бумажной подложки и переносят на предметное стекло, растворяют в капле физиологического раствора и смешивают с изучаемой культу­рой вибрионов.

При положительной реакции через 1—3 мин появляют­ся зерна агглютината, окрашенные в зеленый цвет, а кап­ля просветляется. При отрицательной реакции капля оста­ется гомогенно-мутной.

Использованную часть полимерной пленки отрезают, а ос­тавшуюся часть пленки с ИХМП сохраняют в той же чаш­ке Петри для дальнейших исследований. Использование ИХМП в исследованиях вибрионов и других микроорга­низмов позволяет получить статистически достоверные ре­зультаты, сэкономить дорогостоящие диагностические сы­воротки, повысить качество и эффективность исследований.

***Реакция агглютинации микрометодом.*** В последнее время в бактериологической практике нашел довольно широкое применение микрообъемный метод постановки серологических реакций с использованием спе­циальных планшеток и микротитровальных игл .

Реакции агглютинации микрометодом ставят с холерны­ми агглютинирующими референс-сыворотками в полистроловых микротитровальных планшетках с плоским или V-образ-ным дном, предназначенных для иммунологических реакций, используются мпкротитровальные планшет­ки с объемом лунок 0,4 мл и в пробирках параллельно. Предва­рительно планшетки тщательно промывfют проточной водой, каждую лунку прополаскивали дистиллированной водой и хо­рошо просушивали, затем делали надписи простым каран­дашом.

Во все лунки четырех рядов пипеткой-капельницей из микротитратора Такачи вносят 0,85% раствор хлористо­го натрия (рН 7,2) в объеме 0,05 мл, затем в первую лунку каждого ряда — того же объема соответствующей сыворотки в разведении 1:25 и проводят ее титрацию микротитроваль-ной иглой с головкой (объем 0,05 мл), удаляя из последней лунки по 0,05 мл.

После титрации сывороток во все лунки, кроме их конт­ролей, вносят 0,05 мл взвеси исследуемой агаровой культуры. Эту манипуляцию про­водят на подносе.

По окончании титрации планшет накрывают крышкой и ставят на подносе в термостат при 37° С. После 2-часовой экспозиции проводят окончательный учет реакции под стереомикроскопом (МБС-1, МБС-2) в косопроходящем свете. При учете реакции крышку с планшетки не снимают, в случае ее запотевания заменяют другой.

После учета реакции планшетку и крышку складывают в кювет и заливают 5'% хлорамином так, чтобы все лунки планшетки были заполнены дезраствором.

Исследования показали, что все холерные вибрионы клас­сического и эльтор биоваров агглютинируются холерной ви­довой 0-сывороткой в микрообъемах.

Что касается агглютинабельности типоспецифическими сы­воротками, то прослеживается следующая закономерность:

при постановке с сывороткой Инаба в микрометоде агглюти­нировались 100, а в пробирках—90% штаммов классического холерного вибриона серовара Инаба. Холерные вибрионы био­вара эльтор серовара Инаба агглютинировались в планшет­ках и пробирках соответственно в 95 и 96% случаев. У холер­ных вибрионов классического и эльтор биоваров серовара Огава соотношения в обеих методиках были практически те же.

Интересен факт, что при постановке реакции агглютинации с RO-сывороткой наибольшее число штаммов, агглютинирующихся RO-сывороткой до титра, было выявлено в микро­методе; в пробирках агглютинация установлена у одного штамма.

Все штаммы вибрионов 040—056 сероваров в микромето­де не агглютинировались холерными агглютинирующими сыворотками, а в пробирках штамм II 258-1099 (040 серовара) агглютинировался всеми холерными сыворотками.

Большинство изученных штаммов представителей семейст­ва Enterobacteraceae также не агглютинировалось холерными агглютинирующими сыворотками, за исключением Sh. flexneri 2503, у которого в пробирках была выявлена агглютина­ция со всеми сыворотками, и штамма S. typhimurium 21, у ко­торого отмечена неспецифическая реакция агглютинации со всеми сыворотками как в пробирках, так и в планшетках.

При пользовании этим методом расход агглютинирующих сывороток уменьшается в 10 раз, значительно сокращается время, необходимое для постановки реакции, и ускоряется срок выдачи ответа. Кроме того, описанный метод менее трудоемок. Таким образом, стандартность, достоверность полученных результатов, высокая экономичность метода позволяют реко­мендовать его при идентификации холерных вибрионов, изуче­нии штаммов и популяции штаммов холерных вибрионов по признаку агглютинабельности.

А также:

***Иммобилизация вибрионов холерными сыворотками и типовыми холерными фагами.*** Капли испражнений или материала с поверхности пептонной воды обрабатывают холерной О-сывороткой, типовыми сыворотками Огава и Инаба или типовыми холерными фагами. Готовят из них препараты «раздавленная капля», которые исследуют с помощью темнопольной и фазовоконтрастной микроскопии. В положительном случае через 3-5 минут движение вибрионов прекращается.

***РИФ.*** Препараты из исследуемого материала обрабатывают флюоресцирующей противохолерной сывороткой и исследуют в люминесцентном микроскопе. Положительным результатом считается обнаружение в препарате даже единичных вибрионов с ярким желто-зеленым свечением в виде блестящего ободка по периферии клетки. Положительный результат можно получить через 1-2 часа после начала исследования при концентрации вибрионов не менее 106 клеток в 1 мл., поэтому рекомендуется предварительно подращивание материала на питательных средах.

**Экспресс-диагностика туляремии**

Возбудитель туляремии (Туляре – район Калифорнии) – Franciella tularensis относится к роду с невыясненным положением в систематике микробов. Этиологическая природа туляремии была установлена в 1912 году Г.Мак-коем и Ш.Чепиным, а далее подробно изучена Э.Франсисом.

Туляремия – тяжелая кровяная зоонозная инфекция с природной очаговостью. Основные источники инфекции – водяные крысы, ондатры, зайцы, крысы, мыши. Больной человек неконтагиозен и для возбудителя является биологическим тупиком. Передается трансмиссивным путем через клещей, а нередко и контактным, алиментарным или аспирационным путем.

Возбудитель содержит нуклеопротеидный О- и оболочечный белково-липидный Vi-антиген. У перенесших болезнь вырабатывается очень напряженный и длительный иммунитет.

Материал для исследования:кровь, гной, пунктат бубона, слизь из зева.

***Реакция агглютинации-рассеивания.*** Предложена простая, быстрая, высокочувствительная и специфичная реакция агглютинации-рассеивания, для по­становки которой используется антительный диагностикум. Это суспензия темно-коричневого цвета, представляющая собой комплексное соединение шаровидных крупнодисперсных НК-частиц (Никитин и Котич) и противотуляремийных иммуноглобулинов. Препарат хранят в холодильнике при +4°С в течение 2—3 лет. По истечении 3 лет препарат можно ресенсибилизировать, так как НК-частицы высокостабильны.

Для постановки реакции агглютинации-рассеивания на тщательно обезжиренное предметное стекло наносят слева каплю исследуемого материала (опыт), справа — каплю физиологического раствора или гетерологичного микроба (контроль). Затем к каплям добавляют по одной капле НК-антительного туляремийного диагностикума. Переме­шивание капель производят путем вращательного движе­ния предметного стекла по часовой стрелке и через 1— 5 мин оценивают результаты реакции.

Учет и оценка результатов производятся невооружен­ным глазом, а также с помощью лупы и микроскопа в те­чение 1—5 мин. При положительной реакции в случае на­личия туляремийного микроба или его антигена в иссле­дуемом материале в небольших количествах (до 1—3 млн по стандарту ГКИ) отмечается феномен рассеивания шаро­видных НК-частиц по всей площади капли, что регистриру­ется под малым увеличением микроскопа, а при концентра­ции 3—5 млн и более — феномен образования темно-ко­ричневых зерен агглютината, видимых невооруженным гла­зом. При отрицательной реакции формируется четко очер­ченное, темно-коричневое пятно или точка в центре капли.

Предлагаемая реакция с использованием туляремийно­го НК-диагностикума предназначена для быстрого выяв­ления специфического антигена при исследовании объек­тов внешней среды, пищевых продуктов, трупов павших грызунов, а также в тех случаях, когда из-за массивного пророста посторонней микрофлоры или гибели микроба выделение его посевом или через биологическую пробу не удается. Реакция строго специфична и позволяет обнару­живать туляремийный микроб в небольших количествах (300 тыс. — 1 млн. м.к./мл) или его антиген.

***А также ТИФМ и др.***

**Экспресс-диагностика чумы**

Возбудитель чумы был открыт в 1894 году в Гонконге А.Иерсеном и в его честь был назван Yersinia pestis. К роду иерсиний относятся также Y. pseudotuberculosis и Y. enterocolitica, вызывающие септические гастроэнтероколиты или иерсиниозы.

Чума – особо опасная, очень тяжелая кровяная инфекция, склонная к широкому распространению и дающая высокий процент смертности (от 20 до 100%). Это зоонозная трансмиссивная природно-очаговая инфекция. Источники - крысы, суслики, песчанки, полевки, сурки, мышевидные грызуны.

Переносчики - кровососущие насекомые.

В составе бактерий чумы содержится более полутора десятков специфических и групповых антигенов. Переболевшие приобретают пожизненный, устойчивый иммунитет фагоцитарного характера.

Материал для исследования:содержимое бубонов, отделяемое язв, мокрота, кровь, испражнения.

***Метод бумажных индикаторных систем.*** Классические методы (посев на среды Гисса) громоздки, требуют много времени и большого количества питательных сред, имеющих ограниченный срок годности. В настоящее вре­мя эти методы не удовлетворяют запросам противочумной сис­темы. В настоящее время наибо­лее перспективным методом определения ферментативной активности штаммов возбудителя чумы с целью идентификации выделяемых культур и изучения их свойств можно считать метод углеводно-бумажных дисков, предложенный В.М.Никитиным и С.В.Плугару. В качестве среды лучше использовать бульон Хоттингера, т.к. он дает наиболее быструю ферментацию – 3 часа. Целе­сообразно применять БИС в полевых условиях, так как наборы компактны и могут длительное время храниться при комнатной температуре.

***Фаготипирование.*** 1. Внесение бактериофага в исследуемый материал в момент его посева на агар с генцианвиолетом позволяет обнаружить под микроскопом негативные колонии фага или «дорожку» в первые часы, когда рост бактерий еще почти не заметен (через 2,5 – 3 часа). Метод прост, доступен и дает хорошие результаты при высокой концентрации чумного микроба и при относительно большом содержании посторонних микроорганизмов.

2. Определение нарастания титра чумного фага, вносимого в исследуемый материал, где в случае наличия возбудителя фаг начинает размножаться уже через 30-40 минут. В жидкий исследуемый материал (25-50-100 мл) и в контрольную жидкость добавляют столько фага, чтобы получить его разведение 1:50 – 1:100; ставят пробы в термостатах при 370C на 45-60 минут. После инкубации берут 0,5 мл жидкости из каждой пробы и разводят бульоном в 10 раз; из этого первого разведения фага готовят серию последовательных 10-кратных разведений (до 10-10 – 10-11). По 0,5 мл жидкости из каждого разведения исследуемого и контрольного рядов добавляют к 2,5 мл полужидкого агара (0,1%), предварительно расплавленного и затем охлажденного до 48-500С. Тут же к агару добавляют 0,1 – 0,2 мл взвеси 1 – 2 суточной индикаторной культуры (вакцинный штамм чумного микроба), содержащий 15-20 млрд микробов в 1 мл. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и выливают на чашки Петри с 2% агаром Хоттингера. После того, как полужидкий агар застынет, чашки перевертывают дном кверху и ставят в термостат при 370С. Учет результатов производят через 3-4 часа. На фоне сплошного роста индикаторной культуры видны стерильные пятна (негативные колонии фага), количество которых на чашках с исследуемым материалом может превосходить в 100-1000 и более раз число негативных колоний на контрольных чашках. Благодаря хорошей диффузии фаговых частиц и бактериальных клеток через полужидкий агар двухслойный метод дает стерильные пятна большего размера, чем при размазывании исследуемой массы шпателем по поверхности агара. Подсчет колоний ведут в счетной камере.

***А также: РИФ, РПГА и др.***

**Некоторые другие методы**

***Хемилюминесцентный иммуноанализ.*** Новым этапом на пути развития иммунологических методов диагностики ООИ является хемилюминесцентный иммуноанализ — ХЛИА. Преимущество этого метода определяется его высокой чувствительностью, относительной простотой и произ­водительностью, возможностью полной автоматизации

В открытой литературе имеются отдельные сообщения, по­священные применению ХЛИА в медицинской микробиологии, как для обнаружения бактериальных антигенов, так и для поиска специфических антител

Цель нашей работы заключалась в отработке оптимальных условий постановки ХЛИА для ускоренной диагностики ООИ, сравнительной оценке этого теста с общепринятыми реакция­ми — МФА, РПГА и ТИФА.

Объектами исследования служили взвеси возбудителей чу­мы, сапа, мелиоидоза, бруцеллеза и сибирской язвы, обезза­раженные 0,5% формалином, всего 100 штаммов.

Специфичность препаратов и метода контролировали на 42 штаммах близкородственных и гетерологичных микроорга­низмов.

В качестве диагностических препаратов для обнаружения возбудителей чумы, сапа, мелиоидоза, бруцеллеза и сибирской язвы в ТИФА и ХЛИА использовали специфические иммуно-пероксидазные конъюгаты к соответствующим возбудителям ООИ, полученные методом перйодатного окисления на основе иммуноглобулинов из кроли­чьих иммунных сывороток и пероксидазы, рабочее разведение которых составляли соответственно 1:200—1:300 и 1:1000—1:1500.Подготовку и постановку ТИФА и ХЛИА осуществляли общепринятым способом В качестве субстратов использовали: для ТИФА — о-фенилендиамин, для ХЛИА — смесь люминола с перекисью водо­рода и р-йодфенола. Постановку МФА и РПГА проводили по общеизвестной ме­тодике.

Результаты ТИФА и РПГА учитывали визуально, МФА — при помощи люминесцентного микроскопа, ХЛИА — на люминометре.

Чувствительность ХЛИА на 1—2 по­рядка выше, чем ТИФА и на 2—4 порядка превышает чувстви­тельность общепринятых тестов — МФА и РПГА. При этом ме­тод достаточно специфичен.

Хемилюминесцентный анализ при использовании автомати­ческих приборов постановки и учета результатов отличается экономичностью и высокой разрешающей способностью, за­служивает внедрение в практику медицинских и ветеринарных лабораторий.

Специфичность ХЛИА зависит от качества использован­ных иммуноглобулинов. На 42 близкородственных и гетероло-гичных штаммах положительные реакции получены с Y. pseu-doTuberculosis 816111(37°) с чумными общими ИПК и В. sereus 1 и 3 с сибиреязвенными ИПК в концентрациях 1 -106 м. т./мл.

ХЛИА следует рекомендовать для лабораторной диаг­ностики ООИ особенно в тех случаях, когда в исследуемом ма­териале предполагается незначительное содержание возбуди­теля.

***Иммуноблотинг.*** Иммуноблоттинг — разновидность гетерогенного иммун­ного анализа. Сущность его заключается в переносе молекул исследуемого вещества с одного твердого носителя, исполь­зуемого для фракционирования биополимеров, на другой, где с помощью иммунохимической реакции происходит их специ­фическое выявление.

В зависимости от исследуемого вещества различают ДНК,— РНК и белок — блоттинг.

При постановке иммуноблоттинга соблюдается следующая методическая последовательность: электрофоретическое разделение анализируемого материала на индивидуальные белки или полипептиды в геле; получение реплики путем блоттинга белков или полипептидов с геля на твердофазный матрикс; блокирование фона, отмывка от компонентов, используемых при блокировании фона; инкубирование со спе­цифической тест-сывороткой; отмывка от избытка сыворотки; инкубирование с Jg к антителам специфической тест-сыворот­ки, конъюгированными с меткой; отмывка от избытка меченого иммунореагента; выявление тестируемых антигенов авторадиографически или ферментативно по реакции с соответствующим субстратом.

Иммунохимическое выявление антигенов можно прово­дить с помощью антител, конъюгированных с меткой. В ка­честве метки в последнее время широко применяют либо ра­диоактивные изотопы, либо ферменты (пероксидазу, щелоч­ную фосфатазу, лактамазу и др.).

Время блоттинга путем диффузии составляет 36—48 ч. Но наиболее быстрый и эффективный способ переноса белков с гелей — электроблот, время которого, в основном, составляет 1—3 ч (2), для некоторых высокомолекулярных белков— более 12 ч.

Конкретный выбор сорбентов для различных модификаций блотов (нитроцеллюлоза либо бумага, обработанная соответствующим образом), выбор условий блокирования и иммуно-химического выявления антигенов полностью зависит от анти­гена, его количества, метода иммуноанализа и целей исследо­вания.

Метод ИБ по целому ряду обстоятельств получил наиболь­шее распространение как метод, пригодный для использования в качестве теста подтверждения.

Безусловное достоинство метода — возможность тести­рования антител к слабо или вовсе нерастворимым антигенам и исключение стадии введения радиоактивной метки в антигены.

О чувствительности в случае ИБ судят по предельному коли­честву нанесенного на гель антигена, которое при фракциони­ровании белков удается выявить иммунохимически после пере­носа с геля на твердую фазу (нитроцеллюлозу). Общая чувствительность анализа зависит от целого ряда причин: условий фракционирования и иммобилизации антигена на твердом но­сителе, уровня фона, специфичности и аффинности антител. Важное значение имеет вид используемой метки и способ ее выявления.

Таким образом, метод иммуноблотинга позволяет иденти­фицировать зоны антигена на твердой фазе, не связывая весь белок с антителами специфической сыворотки. Иммуноблотинг и его модификации в основном используются для типирования бактериальных и вирусных антигенов и антител, особенно в случае недостаточной разрешающей способности обычных систем, а также при анализе иммуноглобулинов, нуклеиновых кислот или как тест подтверждения в сочетании с другими методами.

***Обнаружение возбудителей, антигенов и антител при помощи суспензионных препаратов.*** Принцип: фиксированные на частицах компоненты вступают в реакцию антиген-антитело, которая сопровождается образованием крупных, видимых невооруженным глазом агломератов.В суспензионных препаратах для обнаружения и количествен­ного определения антигенов и антител используется свойство мно­гих неорганических и органических веществ, таких как активиро­ванный уголь, дерматол, бентонит, каолин, гидроокись алюминия, силикаты, сульфат бария, полистирол и т. д. физически сорбировать биополимеры на своей поверхности.

В. Никитина применила цветные целлюлозные антигены для ускоренной диагностики чумы и туляремии, которые за 5—10 ми­нут дают возможность в реакции непрямой агглютинации обнаружить иммунные антитела. Eisler показал, что животный уголь адсорбирует антитела против холерного гемолизина. Величина адсорбции антигемолизинов зависит от титра антигемолитической сыворотки. Животный уголь интенсивно адсорбирует антигемолизины из сывороток с не­высоким титром антител. С возрастанием титра антигемолитических сывороток интенсивность адсорбции антигемолизинов углем уменьшается. Древесный уголь или частички химически чистого угля могут быть использованы как носители антител аналогично латексу и бентониту. Препараты типа угольных сывороток обладают двумя ценными свойствами: они сохраняются длительное время в сухом виде и не нуждаются в до­бавлении консервантов. Как пока­зали исследования Р. X. Яфаева, антитела могут быть фикси­рованы на поверхности частиц активированного угля адгезионным методом — путем прикрепления антител к частицам пленкой де­натурированного белка. Суспензия частиц угля, содержащая ад­сорбированные антитела специфически агломерирует при добавле­нии к ней гомологичного антигена.

Использование анионообменной смолы в качестве носителя ан­тител нашло применение при обнаружении возбудителей холеры и везикулярного стоматита. Частицы смолы, соединенные с анти­телами, агглютинируют при добавлении материала, содержащего специфический антиген.

**Заключение**

Существует большое разнообразие методов экспресс-диагностики особо опасных инфекций, основанных на различных принципах. Выбор того или иного должен производится в соответствии с техническими возможностями лаборатории, контингентом зараженных людей, характером и масштабом распространения предполагаемой инфекции. Диагностику необходимо провести в наиболее короткие сроки, так как от этого зависит эффективность изоляции и лечения больных. При работе с патологическим материалом важно учитывать и предупреждать возможность заражения медицинского персонала, поэтому надо строго соблюдать инструкции по сбору материала от больных.

Классические методы экспресс-диагностики в большинстве своем исчерпали себя, в связи с этим необходимо разрабатывать принципиально новые, такие как ПЦР и др. и автоматизировать существующие.

Таким образом, экспресс-диагностика ООИ и по сей день остается актуальной и одной из важнейших задач микробиологии и эпидемиологии.

**Список использованной литературы**

**1.** Ускоренные методы диагностики инфекционных болезней (сб. тр.) –Кишинев, «ШТИИНЦА», 1987.

**2.** Препараты для экспресс-диагностики (сб. тр.) – Ленинград, 1981.

**3.** Иммунохимия и лабораторная диагностика особо опасных инфекций (сб. тр.) – Саратов, 1985.

**4.** Щербак Ю.Ф. Особо опасные инфекции – М., «Медицина», 1975.

**5.** Ранняя и дифференциальная диагностика основных инфекционных заболеваний (уч.-мет. пособие) – Ленинград, 1988.

**6.**  Медицина катастроф (уч. пособие) – М., «ИНИ Лтд», 1996.

**7.** Лебедева М.Н. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии – М., «Медицина», 1973.

**8.** Борисов Л.Б., Козьмин-Соколов Б.Н., Фрейдлин И.С. Руководство к лабораторным занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии – М., «Медицина», 1993.

**9.** Повлович С.А. Медицинская микробиология в графах – Минск, «Вышэйшая школа», 1986.