**Вопрос 1. Методы микробиологической диагностики инфекционных болезней : бактериоскопический, бактериологический, биологический, серологический , аллергический, собственно иммунный. Их достоинства и недостатки.**

**Бактериоскопический метод-(микроскопический).**

Цель: обнаружение микроба возбудителя в патологическом материале больного путем микроскопии.

Этапы:

1.Готовим мазки из патологического материала.

2.Окраска простыми и сложными методами и идентификация возбудителя по морфологическим и тинкториальным свойствам. Этого не достаточно в большинстве случаев, потому что по этим свойствам многие бактерии сходны друг с другом.

«-» малая информативность , малая чувствительность (т к должно быть не менее 100000 в 1 мл), не используется в качестве самостоятельного вида диагностики.

«+» быстрота, простота, дешевизна.

**Бактериологический метод-**

Цель: выделить микроб возбудитель в чистой культуре и идентифицировать его по совокупности многих биологических свойств.

Этапы:

1.Выделение чистой культуры.

Микроскопия окрашенного препарата по Грамму.Получение отдельных изолированных колоний. Для этого патологический материал больного засеивают на элективные твердые питательные среды методом механического разобщения, чтобы получить изолированные колонии.(описание макро и микроскопических признаков колоний.

2.Накопление чистой культуры. Для этого из подозрительных колоний делаем высев на скошенный агар.

3.Приготовить мазки окрасить по Грамму. Сделать посев на дифференциально диагностическую среду. Идентификация по морфологическим , тинкториальным, культуральным, биохимическим, антигенным, фаголизабельным факторам патогенности.

«+» Высокая информативность, высокая чувствительность, 1000 микробных клеток в 1 мл. Возможно определить чувствительность бактерий к антибиотикам и антисептикам.

**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.

**Серологический метод-**

это обнаружение антител к определенному антигену в сыворотке

больного и определение их титра. Используются серологические

реакции: реакция агглютинации (РА), реакция непрямой

гемагглютинации (РНГА), реакция связывания комплемента (РСК), и др.

Существует два способа подтверждения диагноза заболевания

серологическим методом: 1 – определения наличия антител в

диагностическом титре; 2 – определение природы антител. По природе

антитела могут быть: **инфекционные, прививочные,**

**анамнестические.** Природу антител определяют при исследовании

парных сывороток. **Парные сыворотки** – это две сыворотки, взятые у

больного с интервалом в 5-10 дней. Титр инфекционных антител в

парных сыворотках возрастает в 4 раза и более, что подтверждает

клинический диагноз заболевания. Титр анамнестических и

прививочных антител в парных сыворотках не меняется или меняется

незначительно. Для обнаружения антител необходимы известные

антигены. Диагностические препараты, содержащие антитела и

используемые для серологической диагностики, называются

**диагностикумы.** Диагностикумы могут содержать взвесь убитых

микробов, отдельные антигены микробов, эритроциты с нагруженным

на их поверхность антигеном (эритроцитарные диагностикумы).

**Реакция агглютинации –** склеивание корпускулярных антигенов под

действием антител в присутствии электролита. Реакция агглютинации

используется для идентификации бактерий по антигенной структуре, в

этом случае она ставится на предметном стекле (ориентировочная

реакция), для идентификации бактерий по антигенной структуре

необходимы диагностические агглютинирующие сыворотки.

Диагностические сыворотки – это сыворотки крови кроликов,

иммунизированных определенными микробными антигенами.

Реакция агглютинации используется также для определения титра и

природы антител в серологическом методе диагностики. В этом случае

ставится развернутая РА с использованием диагностикумов.

**Нагрузочные реакции иммунитета –** реакции, в которых антиген

нагружается на какой-либо носитель. В качестве носителя антигена

используются эритроциты (РНГА), частицы латекса (латексная

агглютинация), убитые микробные клетки (коагглютинация), частицы

активированного угля (угольная конгламерация).

**Реакция Кумбса.** Реакция Кумбса используется для определения

неполных антител. Неполные антитела – антитела с одним активным

центром (одновалентные антитела), они не дают видимых реакций при

взаимодействии с антигеном. В реакции Кумбса используется

антиглобулиновая сыворотка (АГС), с помощью которой можно увидеть

результат реакции по выявлению неполных антител.

**Аллергический-**

аллергический   метод  направлен на выявление повышенной чувствительности организма к специфическому аллергену, которым является возбудитель заболевания. Примером этого метода является постановка кожно-аллергических проб. В основе метода лежит феномен гиперчувствительности замедленного типа. Аллергические диагностические пробы — диагностические реакции, выявляющие состояние повышенной чувствительности организма к соответствующим аллергенам.
Сенсибилизированный организм отвечает на введение аллергена необычной реакцией местного или общего характера, степень которой определяется видовыми и индивидуальными свойствами организма, особенностями аллергена и способами его введения (см. Аллергия, Анафилаксия). Аллергическое состояние возникает при ряде инфекционных заболеваний (туберкулез, бруцеллез, пневмококковая пневмония, сап, токсоплазмоз и др.), однако практическое применение аллергические диагностические пробы получили при ограниченном числе заболеваний. Диагностическая ценность А. д. п. определяется их специфичностью, чувствительностью и безопасностью для человека или животного. Аллергическое состояние возникает через некоторое время после начала инфекции, что необходимо учитывать при постановке А. д. п. Диагностическая ценность А. д. п. заключается в том, что с их помощью удается выявить атипичные и хронические случаи заболеваний, когда установление диагноза по клиническими микробиологическим данным затруднительно. Так как аллергическое состояние организма сохраняется в течение длительного срока после перенесенного заболевания, то А. д. п. могут быть использованы также для постановки ретроспективного диагноза.

**Собственно иммунный-** Цель метода – индикация и

идентификация антигенов возбудителя в исследуемом материале.

Используются РП, РИФ, ИФА, РСК. Собственно иммунный метод – это

экспресс-диагностика, результат исследования получается в течение

нескольких часов или одних суток.

**Реакция преципитации** – это осаждение мелкодисперсного растворимого

антигена под действием антител в присутствии электролита. Реакция очень

чувствительна в отношении антигена, она позволяет обнаруживать и

идентифицировать буквально следы антигена. Варианты постановки: реакция

кольцепреципитации, реакция преципитации в геле (агаре). Модификации

РП: иммуноэлектрофорез, радиальная иммунодиффузия по Манчини,

иммуноблотинг. Реакция преципитации применяется для индикации и

идентификации антигена в исследуемом материале. РП получила

распространение в судебно-медицинской экспертизе, используется для

определения принадлежности пятен биологических жидкостей по видовой

принадлежности белка. РП в агаре используется для определения

токсигенности культур микроорганизмов (при диагностике дифтерии,

стафилококкового токсикоза). Метод радиальной иммунодиффузии по

Манчини используется для определения разных классов иммуноглобулинов в

сыворотке крови. Иммуноэлектрофорез используется для определения

белковых фракций сыворотки крови.

Преципитирующие сыворотки получают иммунизацией кроликов антигенами

бактерий, их экстрактами и токсинами. Титром преципитирующей сыворотки

называется то максимальное разведение антигена, при котором идет реакция

преципитации. Преципитирующие сыворотки выпускаются с высоким

титром - не менее 1:100000. Это связано с тем, что антиген, определяемый в

реакции преципитации, имеет мелкодисперсную структуру и в единице

объема его может содержаться больше, чем в таком же объеме сыворотки -

антител.

Специфические преципитирующие сыворотки применяются при диагностике

инфекционных заболеваний (сибирская язва, чума, туляремия, дифтерия, и

др.), в судебно-медицинской экспертизе для определения видовой

принадлежности белка, в санитарной практике для обнаружения соответствия

белковых веществ в продуктах (при подозрении на фальсификацию).

**Реакция нейтрализации** – способность антител нейтрализовать токсины,

вирусы, яды змей. Используется для индикации и идентификации токсинов,

для идентификации вирусов, и др. РН не дает видимого результата in vitro,

поэтому она учитывается по биопробе на животных или в культуре ткани. РН

in vivo может быть использована для определения степени напряженности

антитоксического иммунитета в организме человека (пробаШика).

**Реакция флоккуляции** (РФ) - используется для титрования

антитоксических сывороток, токсинов и анатоксинов. В реакции

флоккуляции в качестве антигена участвует токсин или анатоксин. При

смешивании их в эквивалентных соотношениях с антитоксической

сывороткой появляется помутнение, а затем рыхлый осадок. Механизм РФ

сходен с таковым реакции преципитации.

В реакциях нейтрализации и флоккуляции участвуют в качестве компонентов

токсины, анатоксины, антитоксины (антитоксические сыворотки).

**Реакция иммунофлюоресценции (РИФ).** Разработана А. Кунсом и носит

его имя (метод Кунса). Это один из методов исследования, в котором

используются меченные антитела. В качестве метки используется краситель,

дающий свечение в ультрафиолетовых лучах (изоцианат флюоресцеина или

просто флюорохром). Риф используется в двух модификациях: **прямой**

**метод Кунса и непрямой метод Кунса.** Прямой метод: исследуемый

материал, зафиксированный на предметном стекле, обрабатывается меченой

флюорохромом диагностической сывороткой; обязательный этап реакции –

отмывка от непрореагировавших антител; если в исследуемом материале есть

искомый антиген, меченные антитела фиксируются на антигене и после

отмывки такой комплекс выявляется по свечению при просматривании

препарата под люминесцентным микроскопом. Непрямой метод: в этом

случае реакция идет в два этапа – на первом этапе используется немеченая

диагностическая сыворотка, на втором этапе используется меченая

флюорохромом антиглобулиновая сыворотка; с помощью непрямого метода

можно выявлять в исследуемом материале как наличие антигена, так и

наличие и титр специфических антител.

Люминесцирующие (флюоресцирующие) сыворотки представляют собой

иммунные сыворотки, содержащие специфические антитела, меченые

флюоресцирующими красителями. При приготовлении люминесцирующих

сывороток проводят присоединение к глобулиновой фракции иммунной

сыворотки флюорохромов путем прочной химической связи. Люминес

цирующие сыворотки используют при постановке РИФ.

Антиглобулиновые сыворотки (АГС) содержат антитела к иммуног-

лобулинам сыворотки человека или кролика - в зависимости оттого, какая

иммунная сыворотка используется в реакции. АГС получают путем

иммунизации животных иммуноглобулинами человека или кролика. Такие

сыворотки используют для постановки непрямой РИФ, реакции ИФА, реак-

ции Кумбса.

**РСК** отличается высокой чувствительностью и специфичностью и применяется для;
1) серологической диагностики инфекционных заболеваний
2) идентификации бактерии и др. микробов.
РСК относится к сложным серологическим реакциям, в которых участвуют, кроме АГ- АТ-, ещё гемолитическая система (р. гемолиза), выявляющая результат реакции.

РСК проводится в два этапа при участии двух систем:
1) Первая система — АГ+АТ-(-комплемент — обуславливает связывание комплемента в том случае, если АТ соответствует АГ, В случае же несоответствия АТ и АГ комплемент остаётся свободным;
2) Вторая система (индикаторная) — гемолитическая сыворотка (гемолизины) + эритроциты — показывает исход реакции в первой системе: в случае положительного результата реакции в первой системе (образования комплекса АГ+АТ+комплемент) во второй системе не произойдет гемолиза ввиду отсутствия комплемента (эритроциты оседают на дно пробирки). В случае отрицательного результата в первой системе вторая сопровождается гемолизом, т.к. образуется комплекс эритроциты + гемолизины + комплемент.

Компоненты реакции:
1) испытуемая сыворотка (предварительно инактивируют нагреванием при 56 «С в течение 30 минут);
2) антиген (изготавливается из взвесей убитых микробов, лизатов микробов, полных АГ, гаптенов, экстрактов тканевых липидов);
3) комплемент;
4) гемолитическая сыворотка;
5) 3 % взвесь эритроцитов барана,
6) физиологический раствор;
7) контрольная сыворотка.

Комплемент, В качестве комплемента в РСК применяют свежую и высушенную сыворотку морской свинки, т. к. в крови морской свинки комплемент содержится в наибольшем количестве и присутствует постоянно, чем у др. животных. Перед постановкой РСК следует проводить титрование комплемента в реакции гемолиза (эритроциты барана, гемолитическая сыворотка, комплемент, физ. раствор) и определение рабочей дозы.

Титр комплемента — наибольшее разведение комплемента, которое вызывает полный лизис эритроцитов в присутствии гемолитической сыворотки.

Рабочая доза комплемента — количество комплемента, которое выше тира на 25 %.

Гемолитическая сыворотка готовится путём иммунизации кроликов 50 % взвесью эритроцитов барана. Полученную сыворотку инактивируют нагреванием при 56 °С. Определяют титр и рабочую дозу.

Титр сыворотки — максимальное разведение сыворотки, которая вызывает полный лизис эритроцитов в присутствии комплемента. В качестве рабочей дозы берут гемолитическую сыворотку в тройном титре.

**Метод иммуноферментного анализа** (**ИФА**) во многом напоминает РИА, но включает использование коммерческих реагентов — Аг или AT, маркированных ферментами (например, пероксидазой или щелочной фосфатазой). После образования иммунного комплекса в систему вносят субстрат, расщепляемый ферментом, что приводит к окрашиванию среды в жёлто-коричневый (при использовании псроксидазы) или жёлто-зелёный цвет (при использовании фосфатазы).

По сравнению с классическими методами выявления Аг, **иммуноферментный анализ** ( **ифа** ) позволяет непосредственно регистрировать взаимодействие Аг с AT в специфической фазе, а не анализировать вторичные проявления взаимодействия — агглютинацию, преципитацию или гемолиз. Метод отличает высокая чувствительность — обычно достаточно присутствия Аг в концентрации I нг/мл. К настоящему времени созданы многочисленные модификации базовой методики.

Наибольшее распространение получил гетерогенный **иммуноферментный анализ** ( **ифа** ) на твёрдой фазе (**твердофазный ИФА**). Для этого коммерческие моноклональные AT или Аг фиксируют на лунках пластиковых панелей, куда затем вносят исследуемый материал (содержащий Аг или AT).