

ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. ЧАСТЬ 2. ЛАБОРАТОРНЫЕ СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

Доц. С. В. БУРОВА, доц. М. П. ОНУХОВА, доц. Т. Я. ЧЕРНОБРОВКИНА

DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASES. PART 2. SPECIAL LABORATORY METHODS

S. V. BUROVA, M. P. ONUKHOVA, T. Ya. CHERNOBROVKINA

*Российский Государственный медицинский университет Федерального агентства
по здравоохранению и социальному развитию России, Москва,
Российская Федерация*

Представлены специальные методы диагностики инфекционных заболеваний: микроскопический, бактериологический и молекулярно-генетический.

Ключевые слова: диагностика, инфекция, методы исследования.

Special methods of infectious disease diagnosis (microscopy, bacteriology and molecular genetic) are presented.

Key words: diagnosis, infection, methods of examination.

Этиология инфекционного заболевания может быть установлена как путем обнаружения возбудителя в организме (микроорганизмы, их антигены), так и путем выявления образующихся в ходе развития заболевания специфических антител. Результат микробиологической диагностики зависит от правильности выбора исследуемого материала, достаточного количества биологического материала, стерильности инструментов, соблюдения техники забора материала и доставки его в лабораторию в максимально короткие сроки, а также от возможности забора материала до начала антибактериальной терапии.

Кроме установления этиологии инфекционного заболевания микробиологические методы исследования используют для выявления носителей в очаге, установления формирования хронического бактерионосительства при осуществлении диспансерного наблюдения (тифо-паратифозная группа инфекций, вирусные гепатиты).

В задачи микробиологических исследований входит:

- идентификация микроорганизмов в исследуемом материале;
- определение их видовой принадлежности;
- исследование морфологических, биохимических, токсигенных и антигенных свойств;
- определение чувствительности выделенных микроорганизмов к антимикробным, противовирусным препаратам.

В микробиологической диагностике существует ряд *основных методов лабораторных исследований инфекционных заболеваний:*

- микроскопический;
- бактериологический;
- молекулярно-генетический;

- серологический (иммунологический);
- аллергологический (метод кожно-аллергических проб);
- биологический.

Несмотря на то что проведение микробиологических исследований относится к компетенции микробиологов, каждый врач, имеющий дело с инфекционными заболеваниями, должен знать, как, когда и какой материал необходимо отбирать для анализа, на какие исследования его направлять и как интерпретировать полученные результаты.

Первый этап любого микробиологического исследования составляет правильный выбор материала. Этот выбор определяется свойствами возбудителя и патогенезом заболевания. При поражении отдельных органов и систем целесообразно отбирать материал соответствующей локализации возбудителя и очага поражения. Так, при лихорадке неясного генеза первоначально проводят посев крови. При появлении симптомов, характеризующих поражение отдельных органов, забор материала осуществляют из воспалительных очагов.

Кроме того, при заборе исследуемого материала необходимо учитывать свойства предполагаемого возбудителя. Так, менингококки являются очень нестойкими во внешней среде микроорганизмами, и снижение внешней температуры приводит к их быстрой гибели, поэтому исследование материала необходимо производить максимально быстро после его забора, не допуская охлаждения. Холерный вибрион быстро погибает в кислой среде, и для работы с ним исследуемый материал помещают в щелочную среду (мясо-пептонный бульон).

МИКРОСКОПИЯ

В зависимости от видовой принадлежности возбудителя микроскопический метод подразделяется на *бактериоскопический, вирусоскопический, микоскопический, паразитологический*.

Микроскопия включает приготовление мазков и препаратов, позволяет обнаружить возбудителя в биологическом материале, взятом от пациента, а также определить некоторые морфологические признаки микроорганизма (форма, величина, наличие спор, капсул, включений и т. д.) при световой, темнопольной или электронной микроскопии.

Проводится микроскопия неокрашенных препаратов (нативный материал) и окрашенных препаратов (мазки или мазки-отпечатки), приготовленных из нативного материала, взятого от больного или колоний микроорганизмов, выросших на специальных средах.

Возможности микроскопии заключаются в следующем:

- при исследовании неокрашенных образцов идентификация микроорганизмов проводится по форме возбудителя (лептоспироз, боррелиоз, кампилобактериоз, сибирская язва, столбняк, туберкулез, гельминтозы, актиномикоз, гистоплазмоз);

- микроскопия позволяет наблюдать живые бактерии в препарате, приготовленном по методу «раздавленной капли», так что наблюдаемый объект выглядит более освещенным на темном поле (на 1-й неделе болезни при лептоспирозе используют микроскопию цитратной крови, при малярии — толстой капли);

- своеобразная окраска возбудителя используется для идентификации чумы, дифтерии, менингококковой инфекции, эпидемического паротита;

- определенное расположение микроорганизмов в препарате позволяет говорить об их видовой принадлежности (стафилококки, стрептококки, коринобактерии);

- паразитологические методы позволяют обнаружить гельминты, их фрагменты (головки, членики, обрывки), а также яйца и личинки. Для широкого применения рекомендован метод Като, основанный на обнаружении яиц гельминтов в просветленном глицеринном и подкрашенном маляхитовой зеленью толстом мазке фекалий. Также используют методы обогащения, основанные на разности удельного веса растворов и яиц гельминтов, здесь действуют два принципа: всплывания и осаждения (флотационный метод Калантарян).

Основными разновидностями микроскопии в зависимости от использования светового луча являются светопольная или темнопольная. Используя разные методы изменения светового потока, разделение светового луча и другие свойства оптических систем, удалось создать различные приспособления, увеличивающие возможности микроскопии. Появились фазово-контрастная, люминесцентная, интерференционная, поляризационная, стереоскопическая, ультрафиолетовая, инфракрасная разновидности микроскопии.

Возможности определенных видов микроскопии позволяют работать не только с микроорганизмами, но и с результатами иммуно-химических реакций, происходящих в организме. Так, люминесцентная микроскопия основана на способности некоторых веществ светиться при воздействии коротковолнового излучения. Обычно исследуемые микроорганизмы окрашивают непосредственно либо с помощью антител или лектинов, помеченных флюорохромами. Люминесцентная микроскопия нашла широкое применение для визуализации результатов иммунохимических реакций, основанных на специфическом взаимодействии меченных флюоресцирующими красителями антител с антигенами изучаемого объекта при ОРВИ, гриппе, боррелиозе и др.

Увеличение разрешающей способности микроскопа привело к созданию сложного прибора — электронного микроскопа, позволяющего увидеть очень мелкие микроорганизмы, например вирусы, изучить строение микроорганизмов. Электронная микроскопия с высоким разрешением основана на рассеивании электронов, проходящих через образцы различной плотности, с наблюдением результатов на флюоресцирующем экране и регистрации при помощи фотопластинки. Этот метод позволяет выявлять вирусы, изучая их форму и расположение, например, при вирусных гепатитах, полиомиелите. Электронная микроскопия риккетсий позволяет определить по форме микроорганизмов длительность их пребывания и фазу развития в исследуемом материале.

Несмотря на успехи, достигнутые в области микроскопии, не во всех случаях диагностики инфекционной патологии данный метод является решающим, поскольку не всегда по внешнему виду можно определить принадлежность микроорганизма; в ряде случаев в препарате не оказывается возбудителя, поскольку нет достаточного количества материала для исследования. Кроме того, метод микроскопии не всегда имеет широкое распространение (особенно электронная микроскопия), что связано со сложностью аппаратуры и обслуживания, дороговизной оборудования.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Использование бактериологического метода позволяет выделить возбудителя заболевания в чистой культуре и точно идентифицировать его принадлежность. При клинической оценке бактериологических исследований следует помнить, что выделение микроба еще не означает определение возбудителя. Чтобы выделенный микроб назвать возбудителем, необходимо провести клинико-лабораторные параллели и ответить на вопрос: может ли выделенный микроб обусловить данную клиническую картину? Выделенный микроорганизм может быть и возбудителем основного заболевания, и причиной сопутствующего заболевания, а может совершенно не иметь никакого отношения ни к основной, ни к сопутствующей патологии.

Бактериологический метод основан на способности возбудителя продолжать свою жизнедеятельность вне организма, для чего используют различные субстраты (среды), при помещении в которые возбудитель может размножиться и проявлять свои биохимические свойства. То есть этот метод заключается в посеве биологического материала больного на питательные среды с последующей идентификацией возбудителя и изучением его морфологических признаков и ферментативной активности. Так же возможно провести определение чувствительности выделенной культуры к химиопрепаратам.

Большинство бактерий способно расти на различных питательных средах. Исключение составляют хламидии и риккетсии, не растущие *in vitro* вне клеточных структур. Используемая среда должна содержать вещества, утилизируемые бактериями для различных биосинтетических процессов.

Для успешного проведения бактериологического анализа необходим правильный подбор сред, температурного режима, что обусловлено особенностью и спецификой микроорганизмов. Например, возбудители брюшного тифа и паратифов лучше растут на средах с добавлением желчи (желчный бульон), лептоспиры и менингококки — на средах с добавлением сыворотки, возбудитель холеры — в щелочном бульоне, возбудителю чумы для нормального роста необходимо добавление микробов-«кормилок».

Важный признак — своеобразие роста микробной флоры, что позволяет различать виды, роды и даже типы бактерий. Некоторые микроорганизмы выделяют гемолизины — ферменты, разрушающие эритроциты, поэтому чашки с посевами следует рассматривать против источника света. Подобный рост характерен для пневмококка, стрептококка, стафилококка и листерии.

Для изучения особенностей метаболизма бактерий используют дифференциально-диагностические среды, включающие различные индикаторы. К ним относятся среда Эндо, Левина для семейства энтеробактерий. К дифференциально-диагностическим средам относятся среды, определяющие способность микроорганизмов ферментировать углеводы, расщеплять белки. Достаточно широко используются хроматографические методы, позволяющие установить систематическое положение каждого вида. Для изучения биохимической активности бактерий широко применяют системы индикаторных бумажек или наборы мультимикротестов, например для дифференциальной диагностики энтеробактерий и нейссерий.

В связи с разнообразием самих бактерий и их питательных потребностей создать универсальную среду практически невозможно. В настоящее время идет совершенствование культурального метода диагностики в направлении повышения качества питательных сред, создания селективных сред для различных групп бактерий. В со-

временных условиях, когда в патологии человека существенно возросла роль условно-патогенных микроорганизмов, только бактериологический метод позволяет оценить их истинную роль в инфекционном процессе.

Основным недостатком бактериологического метода исследования является его продолжительность. Для быстрорастущих возбудителей (холерный вибрион, дифтерийные бактерии) это может быть 32–36–48 ч, для большинства микроорганизмов минимальный срок составляет 3–4 дня, а для медленно растущих бактерий (например, возбудители туберкулеза, бруцеллеза) этот срок исчисляется неделями. Другим существенным недостатком бактериологического исследования является то, что из инфицированного материала не всегда удается получить рост возбудителя. Это может быть связано с его низкой концентрацией в биологическом материале, трудностями культивирования отдельных групп микроорганизмов, возможностью перехода бактерий в некультивируемое состояние — L-формы, проведенным лечением антибактериальными препаратами до забора материала и т. д.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД — ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

В настоящее время все большее развитие получают молекулярно-генетические методы диагностики, цель которых — обнаружение в исследуемом материале фрагментов ДНК/РНК микроорганизмов. При этом применяют метод ДНК-гибридизации и полимеразную цепную реакцию. Метод ДНК-гибридизации, основанный на способности денатурированной одноцепочечной ДНК возбудителя достраивать гомологичную цепь в бесклеточной системе, появился сравнительно недавно, в 1964 г. На основе метода ДНК-гибридизации в 1985–1995 гг. был разработан еще один метод — метод направленной амплификации (воспроизведения) ДНК или РНК, позволяющий найти в исследуемом клиническом материале небольшие участки генетической информации (ДНК или РНК) любого организма и многократно размножить их. Этот метод, известный в настоящее время под названием полимеразная цепная реакция, включает в себя качественный и количественный методы исследования.

Качественный метод исследования позволяет определить наличие ДНК или РНК возбудителя; генотип возбудителя.

Большое значение качественный метод исследования имеет для ранней диагностики заболеваний, когда антитела еще не появились или их концентрация очень мала и недоступна для определения. Кроме того, этот метод позволяет выявить скрытые формы болезни, определить ведущий агент при наличии нескольких возбудителей, прогнозировать дальнейшее течение болезни.

Количественный метод исследования позволяет определить вирусную нагрузку, контроли-

ровать проводимое лечение, выявлять скорость снижения вирусемии и эффективность вводимых препаратов.

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ (ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ) РЕАКЦИИ

Серологические (иммунологические) методы исследования, основанные на специфическом взаимодействии антигенов и антител, используются для лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней, выявления лиц, ранее перенесших инфекционное заболевание, определения напряженности иммунитета, определения групп крови, тканевых и опухолевых антигенов, видовой принадлежности белка, распознавания аллергии и аутоиммунных болезней, беременности, гормональных нарушений, а также в научно-исследовательской работе.

Серологические методы широко применяются в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний. Особую ценность серологические методы имеют в тех случаях, когда выделить возбудитель не представляется возможным. Выявление результатов иммунологических реакций может проводиться в различных средах: сыворотке и плазме крови, спинно-мозговой жидкости, моче, слюне и т. д.

Антитела в сыворотке крови обследуемого могут иметь различное происхождение. Они могут быть связаны с протекающим настоящим заболеванием (*инфекционные антитела*), с ранее перенесенным заболеванием (*постинфекционные*) и с произведенной вакцинацией (*поствакцинальные*). В ходе инфекционного процесса между антигенами возбудителя, их токсинами и антителами иммунной системы организма происходят реакции, в результате которых образуются иммунные комплексы «антиген — антитело».

Серологические реакции различаются по способности выявлять отдельные классы антител. Реакция агглютинации, например, хорошо выявляет IgM-антитела, но менее чувствительна для определения IgG-антител. Реакции связывания комплемента и гемолиза, которые требуют участия комплемента, не обнаруживают антитела, не присоединяющие комплемент, например IgA-антитела и IgE-антитела. В реакции нейтрализации вирусов участвуют лишь антитела, направленные против антигенных детерминант поверхности вируса, связанных с патогенностью.

Серологические реакции отличаются высокой чувствительностью и специфичностью. По чувствительности серологические методы исследования превосходят все другие методы исследования антигенов и антител. В частности, радиоиммунный и иммуноферментный анализы позволяют улавливать присутствие белка в количествах, измеряемых в нанограммах и даже в пикограммах. С помощью иммунологических методов проверяют безопасность крови в отношении наличия вирусов гепатитов и ВИЧ-инфекции и др.

На скорость серологической реакции кроме количественного соотношения антигена, антитела и степени их специфичности влияют температура, pH-среды, концентрация электролитов, условия забора биологического материала (на высоте температуры тела), условия его хранения и доставки к месту анализа, сопутствующая микст-инфекция, предшествующая вакцинация, иммуносупрессия.

Различают *следующие серологические реакции*:

- агглютинации;
- преципитации;
- лизиса;
- нейтрализации;
- связывания комплемента;
- флокуляции;
- опсонизации.

Один и тот же антиген может вызывать разные феномены в зависимости от условий протекания реакций. При эквивалентном количественном соотношении «антиген — антитело» образуются наиболее прочные нерастворимые комплексы (агглютинины, преципитины). При избытке антигена в среде тормозится реакция образования комплексов «антиген — антитело» или эти комплексы становятся растворимыми. Аналогичное явление, хотя и реже, наблюдается при избытке антител. Таким образом, для определенного количества соответствующего антигена существует оптимальное количество антител, при котором образуется максимальное количество иммунных комплексов в минимальный период времени. Невыявление образованных иммунных комплексов «антиген — антитело», невидимых невооруженным глазом, может быть причиной диагностических ошибок.

Серологические реакции делятся на простые и сложные; в сложных кроме антигена и антитела участвует реагирующая система (трехкомпонентные, многокомпонентные серологические реакции). При взаимодействии антитела с корпускулярными антигенами (бактерии, животные клетки) развиваются видимые невооруженным глазом изменения (например, происходит лизис клеток, образуются хлопья агглютината). Если с антителом соединяются растворимые (мелкодисперсные) антигены, то образующиеся комплексы могут быть выявлены в результате предварительной адсорбции антител (антигенов) на корпускулярных веществах (эритроцитах, частичках угля, других компонентах). В этом случае говорят о реакции непрямой, или пассивной, гемагглютинации.

Трехкомпонентные серологические реакции по своему механизму являются реакциями нейтрализации. К ним относят реакции, в которых связывание «антиген — антитело» можно обнаружить по устранению эталонного действия антигена (антитела) на реагирующую систему. Например:

— предотвращение цитопатогенного действия некоторых вирусов в культуре тканей после их взаимодействия с иммунной сывороткой;

– нейтрализация гемолитического действия на эритроциты стафилококкового α -токсина после соединения его с аналогичным антитоксином;

– торможение агглютинации сенсibilизированных антигеном эритроцитов в результате предварительного связывания гомологичных антител сыворотки, введенной в систему свободным антигеном, и др.

Выработка специфических антител при инфицировании человека и развитии инфекционного процесса происходит не одновременно с поступлением антигена. Как правило, наличие специфических антител начинает определяться с конца 1-й – начала 2-й нед, с последующим увеличением количества антител. При таких заболеваниях, как вирусные гепатиты, хламидиозы, туляремия, специфические антитела образуются в более поздние сроки болезни, иногда только к 50-му дню, а при гриппе и других ОРВИ специфические антитела определяются в периоде реконвалесценции, поэтому в направлении на серологические исследования врачу необходимо указать длительность заболевания.

Серологические реакции подразделяют:

– на реакции, направленные на выявление антигенов, что имеет большое значение в ранние сроки инфекционного заболевания;

– реакции, позволяющие выявлять специфические антитела.

Приведем практическое описание некоторых серологических реакций.

Реакция агглютинации бактерий с использованием соответствующей антибактериальной сыворотки относится к наиболее простым серологическим реакциям. Взвесь бактерий добавляют к образцам испытуемой сыворотки крови в различных разведениях и через определенное время контакта при температуре 37 °С регистрируют, при каком наибольшем разведении сыворотки крови происходит агглютинация. Реакцию агглютинации бактерий используют для диагностики многих инфекционных заболеваний: бруцеллеза, туляремии, брюшного тифа и паратифов, шигеллеза, сыпного тифа.

Реакция пассивной, или непрямой, гемагглютинации (РПГА, РНГА) предполагает использование эритроцитов или нейтральных синтетических материалов (например, частицы латекса), на поверхности которых сорбированы антигены (бактериальные, вирусные, тканевые) или антитела. Их агглютинация происходит при добавлении соответствующих образцов сывороток или антигенов. Эритроциты, сенсibilизированные антигенами, называют *антигенным эритроцитарным диагностиком* и используют для выявления и титрования антител. Эритроциты, сенсibilизированные антителами, называют *иммуноглобулиновыми эритроцитарными диагностиком* и применяют для выявления антигенов. Метод РПГА (РНГА) используют для раннего обнаружения антигенов в организме больного и в объектах внешней среды

при дизентерии, брюшном тифе, сальмонеллезе, гастроэнтеритах, холере, чуме, сибирской язве, ботулизме. Для обнаружения специфических антител РПГА (РНГА) используется в диагностике заболеваний, вызванных бактериями (брюшной тиф и паратифы, шигеллез, бруцеллез, чума, холера и др.), простейшими (малярия, амебиаз), вирусами (грипп, аденовирусные инфекции, вирусный гепатит В, корь, клещевой энцефалит, крымская геморрагическая лихорадка).

Реакция нейтрализации антигена (РНА) используется для обнаружения в организме вирусов и токсинов (экзотоксины клостридий, коринобактерий, стафилококка и др.). Применяется для диагностики оспы, кори, паротита, краснухи, вирусных энцефалитов, лихорадки Денге, омской геморрагической лихорадки. Недостатком метода является отдаленное получение результатов (от нескольких суток до 2–3 нед).

Реакция преципитации (РП) является чувствительным, высоко специфическим и относительно простым методом в диагностике менингококковой инфекции, трипаносомоза, полиомиелита, сибирской язвы, малярии, вирусного гепатита В. РП в жидкой фазе протекает очень быстро (1–3 мин), в геле – значительно медленнее (положительный результат можно получить через 2–10 дней). РП имеет ограниченное применение в связи с трудностью получения концентрированных растворимых антигенов для ее постановки.

РЕАКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) заключается в использовании меченных флюорохромом антител, точнее – иммуноглобулиновой фракции антител IgG. Меченное флюорохромом антитело образует с антигеном комплекс «антиген – антитело», который становится доступным наблюдению под микроскопом в УФ-лучах, возбуждающих свечение флюорохрома. Реакцию прямой иммунофлюоресценции используют для изучения клеточных антигенов, выявления вируса в зараженных клетках и обнаружения бактерий и риккетсий в мазках. Так, для диагностики бешенства отпечатки кусочков мозга животных, подозреваемых на вирусносительство, обрабатывают люминесцирующей антирабической сывороткой. При положительном результате в цитоплазме нервных клеток выявляются глыбки ярко-зеленого цвета. РИФ широко применяют для экспрессной (ускоренной) идентификации микробных и тканевых антигенов. Этот метод используют для ранней диагностики гриппа и других ОРВИ, микоплазменной инфекции, шигеллеза, брюшного тифа, сальмонеллеза, бруцеллеза, малярии, чумы, ГЛПС, туляремии, сифилиса, токсоплазмоза, бешенства.

Реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) основана на выявлении комплекса «антиген – антитело» с помощью люминесцирующей

иммунной сыворотки против IgG-антител, используемой для обнаружения не только антигенов, но и титрования антител. Метод нашел применение в серодиагностике герпеса, цитомегаловирусной инфекции, лихорадки Ласса. Применяя меченые иммунные сыворотки против IgM- или IgG-антител, можно дифференцировать тип антител и обнаруживать ранний иммунный ответ по наличию IgM-антител.

Иммуноферментные, или энзим-иммунологические, методы (ИФА) основаны на использовании антител, конъюгированных с ферментами, главным образом с пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой. Чтобы обнаружить соединение меченых антител с антигеном, добавляют субстрат, разлагаемый присоединенным к IgG ферментом, с окрашиванием в желто-коричневый (при использовании пероксидазы) или желто-зеленый (фосфатазы) цвет. Используют также ферменты, разлагающие не только хромогенный, но и люмогенный субстрат. В этом случае при положительной реакции появляется свечение.

Радиоиммунологический метод основан на применении радиоизотопной метки антигенов или антител. Является наиболее чувствительным методом определения антигенов и антител, используется для определения гормонов, лекарственных веществ и антибиотиков, для диагностики бактериальных, вирусных, риккетсиозных, протозойных заболеваний, исследования белков крови, тканевых антигенов. Этот метод технически сложен, но позволяет выявить антигены вируса гепатита в ранний период заболевания у 60–80% больных.

Иммуногистологические методы предназначены для определения антигенов на поверхности или внутри клетки, например для обнаружения маркеров лимфоцитов и иммунных комплексов при гломерулонефритах и других заболеваниях почек. В этой реакции для выявления антигенов пользуются или иммунофлюоресценцией, или иммуноферментными конъюгатами с пероксидазой. Количество специфических антигенов определяют по интенсивности окрашивания. Иногда используют автоматическую регистрацию с помощью спектрофотометра.

Иммуноблоттинг применяют для выявления антител к отдельным антигенам или «узнавания» антигенов по известным сывороткам. Метод включает три этапа: разделение биологических макромолекул (например, вируса) на отдельные белки с помощью электрофореза в полиакриламидном геле; перенос разделенных белков из геля на твердую подложку (блот) путем наложения пластины полиакриламидного геля на активированную бумагу или нитроцеллюлозу (электроблоттинг); выявление на подложке искомым белков с помощью прямой или непрямой иммуноферментной реакции. Как диагностический метод иммуноблоттинг используют при ВИЧ-инфекции. Диагностическую ценность имеет обнаружение антител к одному из белков внешней оболочки вируса.

ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Методы экспресс-диагностики инфекционных заболеваний до недавнего времени развивались главным образом на основе классических схем микробиологического анализа, который сводится к выделению возбудителя в чистой культуре с последующей его идентификацией по многим характерным свойствам. Многоэтапность этих анализов обуславливает их длительность и практически исключает экспрессность, удовлетворяющую эпидемиологическую и клиническую практику. Длительность микробиологического анализа составляет, как минимум, несколько дней. Серологические методы диагностики могут продолжаться от нескольких часов до 2–3 сут. Экспресс-индикация находится на переднем крае научного поиска новых методов обнаружения микробов — простых, экономичных, быстрых, благодаря чему лабораторная служба совершенствуется и эффективно используется в практике инфекционных болезней.

Основные требования, предъявляемые к экспрессным методам диагностики инфекционных заболеваний, сводятся к следующему:

- получение результатов анализа в максимально короткие сроки (в течение нескольких часов, идеально — минут);

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

- бесспорно высокая специфичность и высокая чувствительность как предпосылки надлежащей достоверности анализа;

- высокая производительность, простота, доступность и воспроизводимость анализов.

Наиболее желательным является параллельное применение двух-трех экспресс-методов. Такой подход значительно увеличивает надежность получаемого результата.

К экспресс-диагностике можно отнести методы микроскопии — обнаружение возбудителя в исследуемом материале (столбняк, сибирская язва, менингококковая инфекция, малярия, амебиаз и др.). Результат получают в течение 1 ч после забора материала. Чаще используют серологические (иммунологические) реакции для выявления возбудителя или антигена. Например, реакция нейтрализации холерного вибриона позволяет получить положительный результат уже через 6–8 ч. Усовершенствованная реакция, основанная на использовании в качестве тест-системы иммунодиагностических холерных микропленок (ИХМП), позволяет увидеть положительную реакцию (зерна агглютината, окрашенные в зеленый цвет) уже через 1–3 мин.

Современные тест-системы для экспресс-диагностики снабжены специфическими антителами к нескольким видам микроорганизмов.

Например, для экспресс-диагностики больных гнойным менингитом проводится слайд-реакция нейтрализации; используемая тест-система снабжена специфическими антителами к менингококку, пневмококку, стафилококку. Такие же многокомпонентные тест-системы используют для постановки РИФ при обследовании больных гриппом и другими ОРВИ.

В то же время совершенствуются бактериологические методы, позволяющие выявить рост патогенных микроорганизмов в течение 24 ч.

Экспресс-диагностика отличается простотой и скоростью проведения исследований. Большое практическое значение имеют тест-системы экспресс-диагностики, не требующие для проведения исследования какой-либо аппаратуры и много времени. Они построены по типу тест-полосок с визуальной оценкой результата. На такую полоску достаточно нанести каплю исследуемой плазмы крови — изменение цвета полоски или появление определенного рисунка указывает на наличие в организме больного антигена возбудителя или антител к нему. Например, по такому принципу созданы тест-системы для выявления гепатита В (Гепатит В Гексагон), гепатита С (ИХА-анти-ВГС-ФАКТОР) и др.

Эти методы исследования имеют большее значение при острых инфекционных заболеваниях, однако они не всегда точно могут подтвердить наличие инфекционной патологии при хроническом течении, то есть при бактерионосительстве, когда требуется использование других дополнительных методов.

КОЖНО-АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРОБЫ

При многих инфекционных заболеваниях развивается состояние повышенной чувствительности к повторному введению возбудителя или продуктов его жизнедеятельности. Инфекционная аллергия отличается от других видов аллергии (пищевой, бытовой, лекарственной) не только тем, что обусловлена аллергенами микробной природы, но и тем, что сохраняется и поддерживается лишь при наличии соответствующих микробных агентов и/или их токсинов.

Для выявления инфекционной аллергии применяют кожно-аллергические диагностические пробы. По способу и месту введения аллергена они могут быть *накожными* (скарификационные, аппликационные) и *внутрикожными*. Для постановки внутрикожных диагностических проб используют специфические растворимые антигены возбудителей или извлеченные из микробных клеток аллергические субстанции. Аллергическая реакция основана на развитии очага воспаления в зоне фиксации комплекса «антиген — антитело» (кожа, эндотелий сосудов). Именно характеристика воспалительного очага — величина гиперемии, отечность, болезненность, увеличение регионарных лимфатических узлов — учитывается при оценке

аллергической пробы. Кроме того, при выраженной аллергической реакции на вводимый аллерген возможно появление неспецифической общеинтоксикационной реакции (повышение температуры тела, появление головной боли, слабости, недомогания, артралгий и т. д.).

Кожно-аллергические пробы отличаются простотой постановки, доступностью применения в стационарных и амбулаторных условиях, возможностью получения ответа через 24–48 ч. Метод постановки внутрикожной аллергической пробы одинаков для разных заболеваний: препарат, содержащий аллерген в количестве 0,1 мл, вводится во внутреннюю поверхность предплечья внутрикожно. Результат пробы анализируют через 24 и 48 ч. Наличие зоны гиперемии определенной величины, болезненность в области введения препарата, отек, в ряде случаев — увеличение регионарного лимфатического узла, а также общетоксические проявления через 24 ч говорят о возможном положительном ответе на введенный препарат. Через 48 ч в случае подтверждения диагноза при положительной реакции выявленные сутки назад изменения должны сохраниться в том же объеме или возрасти. Местные изменения при разных заболеваниях могут варьировать. Обязательно регистрируется не только появление папулы, но и измеряется ее размер.

Кожно-аллергические диагностические пробы используют для диагностики туберкулеза (реакция Манту), актиномикоза, аспергиллеза, орнитоза, бруцеллеза (проба Бюрне), туляремии (проба с тулярином), листериоза, лихорадки Ку, сибирской язвы (проба с антраксином) и др. При некоторых заболеваниях кожно-аллергические пробы со специфическими антигенами проявляют положительный ответ на 3–5-й день заболевания (туляремия, сибирская язва, лихорадка Ку) и поэтому могут служить методом ранней диагностики.

При некоторых заболеваниях аллергические перестройки наступают не ранее 20-го дня от начала заболевания и сохраняются годами, поэтому диагноз может подтвердиться в большинстве случаев ретроспективно. В то же время положительная реакция может свидетельствовать и о предшествующей вакцинации или перенесенной когда-то инфекции. Например, кожно-аллергическая проба при бруцеллезе (проба Бюрне) выявляет специфическую сенсibilизацию организма к антигену бруцелл на 20–25-й день от начала заболевания, сохраняется при всех его формах на протяжении всей болезни и многие годы после исчезновения клинических проявлений. Проба Бюрне бывает положительной не только у больных, перенесших бруцеллез, но также у лиц с латентным течением инфекции, у привитых живой бруцеллезной вакциной и у медицинских работников, имевших длительный контакт с бруцеллезным антигеном. Иногда для диагностики эпидемического паротита используют внутрикожную реакцию с паротитным антигеном в виде инактивированного

вируса, однако эта реакция становится положительной только в период реконвалесценции, при этом инфильтрация кожи и покраснение достигают 1–3 см в диаметре.

В ряде случаев при постановке кожно-аллергической диагностической пробы получение положительной реакции нельзя считать подтверждением текущего заболевания, т. к. она может длительное время сохраняться и после перенесенного заболевания и выздоровления (бруцеллез, эхинококкоз, туляремия и др.). С целью диагностики хламидиозов применяется внутрикожная проба со специфическим аллергеном (орнитин).

Приведем краткую характеристику некоторых кожно-аллергических диагностических проб.

Реакция Бюрне при выявлении бруцеллеза. Положительная реакция начинает проявляться через 6–8 ч и держится до 40–50 ч. Учет реакции производится через 24 ч. В положительных случаях отмечается появление болезненной отечности, красноватой или бледной, которая лучше всего определяется ощупыванием места инъекции. Болезненность и покраснение, обычно сопровождающие отек, наблюдаются не во всех случаях. Размер отека составляет 3 см и более в диаметре.

Реакция на выявление туляремии. В положительных случаях отек и гиперемия в месте инъекции, появляющиеся уже через 6–10 ч, отчетливо выражены через 24 ч. Размер папулы — 0,5 см и более. Учет реакции производят через 24–48 ч.

Реакция на выявление сибирской язвы. Положительная реакция сопровождается появлением гиперемированной безболезненной папулы с выраженным отеком и увеличением регионарного лимфатического узла. Размер папулы — 1 см и более. Учет реакции проводят через 24 и 48 ч.

Реакция на выявление хламидиозов. Характеризуется появлением гиперемированной и болезненной папулы диаметром 1 см и более через 10–16 ч, более выражена через сутки.

Реакция на выявление актиномикоза. При положительной реакции не позднее чем через 24 ч появляется эритема различной интенсивности и различных размеров, иногда отечность. Кожная реакция может сопровождаться обострением очагового поражения в виде усиленного отделения гноя, мокроты и общей реакцией с повышением температуры. Описанные явления держатся 1–2 дня. Размер зоны эритемы — 1 см и более.

Реакция Кацони на выявление эхинококкоза. Реакция считается положительной, если на месте инъекции через 5–15–20 мин образуется белый пузырек диаметром около 1,5 см и более, вокруг которого появляется островками гиперемия; островки сливаются в сплошную зону гиперемии, а на периферии появляются новые островки. Изредка наблюдается замедленная реакция — через 24 ч. В некоторых случаях через 24–48 ч появляется инфильтрат. При проведении внутрикожной реакции с эхинококковой жидкостью желательнее до ее постановки и через 24 ч дополнительно исследовать

кровь на эозинофилию. При положительной кожно-аллергической реакции параллельно наблюдается возрастание содержания эозинофилов, иногда довольно значительное.

Реакция на выявление трихинеллеза. При положительном ответе краснота и припухлость появляются через 20–24 ч уже на 2–4-й день болезни.

Необходимо отметить, однако, что введение аллергенов в сенсibilизированный организм иногда сопровождается тяжелыми побочными реакциями. При высокой алергизации организма может быть выраженной местная реакция в виде некроза кожи или развиваться тяжелая общая реакция в виде анафилактического шока. Поэтому любое осуществление кожно-аллергической пробы должно подстраховываться введением антигистаминных препаратов.

При хроническом течении заболевания постановка кожно-аллергической пробы может привести к обострению процесса. Так бывает при бруцеллезе, туберкулезе, хламидиозе, токсоплазмозе глаз и т. д. Кожно-аллергическая диагностическая проба ставится только однократно. Положительная кожно-аллергическая диагностическая проба может свидетельствовать об инфицированности пациента без наличия заболевания или о ранее перенесенной болезни. В то же время отрицательная проба может быть и при наличии заболевания.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Серия этих методов включает определение изменения активности, динамики альтерационных изменений ядра и ряда так называемых *показателей повреждаемости* клеток: появление нейтрофильных гранулоцитов, лизиса лейкоцитов, исчезновение зернистости (дегрануляция базофилов), реакции бластной трансформации лейкоцитов, реакции торможения миграции макрофагов, реакции образования специфических розеток с эритроцитами барана и многих других феноменов, возникающих при контакте сенсibilизированных клеток с аллергеном. Например, показатель повреждаемости нейтрофильных гранулоцитов и реакции иммунолейкоза используют для постановки диагноза при дизентерии, туберкулезе, вирусных гепатитах, стрептококковых инфекциях, токсоплазмозе, бруцеллезе.

Все эти тесты отличаются большой информативностью и специфичностью. Преимущество данных методов заключается в простоте постановки, непродолжительности по времени, абсолютной безвредности и в небольшом объеме крови, требуемой для осуществления большинства реакций.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Биологический метод используется для идентификации возбудителя и токсинов путем заражения лабораторных животных. Экспериментальное моделирование инфекций у чувствительных животных — важный инструмент изучения патогенеза

заболевания и характера взаимодействий внутри системы «микроорганизм — макроорганизм». В экспериментах используют только здоровых животных определенной массы тела и возраста. Установлено, например, что мыши чувствительны к пневмококкам, нейссериям, листериям, возбудителям сибирской язвы, туляремии, чумы, ботулизма, столбняка и коклюша; морские свинки — к возбудителям дифтерии, сапа, чумы, бруцеллеза, туляремии, холеры, ботулизма и псевдотуберкулеза; кролики — к стафилококкам, стрептококкам, нейссериям, возбудителям сибирской язвы, ботулизма и столбняка.

Инфицированный материал вводят животным внутрь разными путями: в дыхательные пути, внутрибрюшинно, внутривенно, внутримышечно, внутрикожно и подкожно. У инфицированных животных прижизненно забирают кровь, экссудат из брюшной полости, а после гибели — кусочки различных органов, спинномозговую жидкость, экссудат из различных полостей. При диагностике инфекций, вызванных действием токсина (ботулизм, столбняк), материал, предположительно содержащий возбудитель и токсин, помещают в физиологический раствор (консервант), а затем фильтруют через бумажные фильтры, натертые тальком (последний хорошо абсорбирует токсин), и смывами с фильтров заражают чувствительных животных. При диагностике инфекций, обусловленных действием патогенных микроорганизмов, лабораторных животных заражают микробной взвесью.

Использование биологического метода целесообразно для:

- быстрого размножения и накопления патогенных микроорганизмов с последующим их изучением (чума, туляремия);
- определения вида токсина — реакция нейтрализации (ботулизм);
- получения специфической воспалительной реакции у определенных видов лабораторных животных (риккетсиозы);
- изучения эффективности химиопрепаратов.

Недостатки биологического метода исследования: обязательное содержание вивария, строгие требования к использованию соответствующих видов лабораторных животных, невозможность их использования для диагностики некоторых антропонозов (вирусные гепатиты).

Таким образом, диагностика инфекционного заболевания представляет собой единый процесс познания, цель которого — установление правильного диагноза. Все перечисленные методы исследования, проводимые для выявления этиологического фактора и подтверждения наличия инфекционной патологии, имеют свои положительные и отрицательные стороны. Поэтому наиболее оправдан комплексный подход с использованием одновременно нескольких методов; следует не только учитывать проявление клинических симптомов, но и ориентироваться на данные эпидемиологического анамнеза, клинические особенности и длительность заболевания, обусловленные специфическими свойствами возбудителя, результаты лабораторных исследований, включая общеклинические анализы, микроскопические, бактериологические, вирусологические и другие методы.

Использованная литература

1. Избранные лекции по инфекционным болезням и эпидемиологии: Учебно-метод. пособ. / Под ред. В. И. Лучшева и С. Н. Жарова. — М.: ГОУ ВПО РГМУ; МИМСП, 2004. — 480 с.
2. Дифференциальная диагностика инфекционных болезней / А. П. Казанцев, Т. М. Зубик, К. С. Иванов, В. А. Казанцев. — М.: Медич. інформ. агентство, 1999. — С. 434–467.
3. Подымова С. Д. Болезни печени: Рук. для врачей. — 3-е изд. — М.: Медицина, 1998. — 704 с.
4. Шлосберг Д., Шульман И. А. Дифференциальная диагностика инфекционных болезней: Пер. с англ. — М.—СПб.: Изд-во БИНОМ — Невский Диалект, 2000. — 320 с.

Поступила 10.12.2008