

АО «Медицинский Университет Астана»  
Кафедра: внутренних болезней интернатуры

СРС

«Бактериологические и иммунологические методы  
исследования, используемые в кардиологии.  
Интерпретация результатов исследований.»

Выполнила: Цепелева Т.

Группа: 785 ВБ

Проверила: Садыкова Д.З.

Астана 2017г

# Содержание

- \* Введение
- \* 1. Бактериологические методы
- \* 2. Иммунологические методы
- \* Заключение
- \* Список литературы

# Введение

Ведущий метод микробиологической диагностики - *бактериологический метод*, т.к. он позволяет выделять и идентифицировать возбудитель, т.е. первопричину болезни. Остальные методы менее информативны, так как они позволяют обнаружить в организме изменения, обусловленные наличием в нем микроба. Второе место по значимости занимает *иммунологический метод*, поскольку взаимодействие антигена и антитела характеризуется высокой степенью специфичности. Поскольку микробиологические исследования являются одним из наиболее дорогих видов лабораторных исследований, перед микробиологом стоит задача постановки достоверного микробиологического диагноза с наименьшей затратой времени, сил и средств. Особое значение приобретают методы экспресс-диагностики, которые позволяют поставить микробиологический диагноз в течение короткого промежутка времени (от нескольких минут до нескольких часов) с момента доставки исследуемого материала в лабораторию. К числу экспресс-методов относятся РИФ, ИФА, РИА, ПЦР, хроматография.



К микробиологическим методам диагностики относят:

- \* 1. Бактериоскопический метод
- \* 2. Бактериологический метод
- \* 3. Биологический метод

- 
- \* **1. Микроскопический метод** заключается в приготовлении препаратов (нативных или окрашенных простыми или сложными методами) из исследуемого материала и их микроскопии с применением различных видов микроскопической техники (световая, темнопольная, фазово-контрастная, люминесцентная, электронная и др.). В бактериологии микроскопический метод получил название бактериоскопического, в вирусологии - вирусоскопического.

- 
- \* **2. Культуральный метод** заключается в посеве исследуемого материала на искусственные питательные среды, культуры клеток или куриные эмбрионы с целью выделения и идентификации чистой культуры возбудителя или возбудителей. В бактериологии культуральный метод получил название *бактериологического*, в микологии - *микологического*, в протозоологии - *протозоологического*, в вирусологии - *вирусологического*.

\* **3. Биологический метод** (экспериментальный или биопроба) заключается в заражении исследуемым материалом чувствительных лабораторных животных или других биологических объектов (куриные эмбрионы, культуры клеток). Его используют для выделения чистой культуры возбудителя, определения типа токсина, активности антимикробных химиотерапевтических препаратов и т.д.

# Бактериологический метод подразделяется на три этапа:

**\* Первый этап - выделение бактерий из первоначальной пробы - включает в себя:**

\*Подготовка. Необходимо правильно взять исследуемый материал, довести его до лаборатории, а также при необходимости обработать.

\*Обогащение. Такая процедура проводится только в том случае, если количества бактерий в полученном материале не хватает. Чаще всего это происходит с кровью. В этом случае, часть крови помещают в теплое место в такую температуру, которая сподвигнет бактерии к размножению.

\*Микроскопия. После того, как все вышеперечисленные процедуры проведены, необходимо исследовать материал под микроскопом для того, чтобы определить микрофлору, количество, а также основные свойства.

\*Создание колоний. После того, как под микроскопом были выявлены различные микрофлоры, каждую из них отделяют и помещают в специальную емкость.

**\* Второй этап - высеивание бактерий и выращивание чистой культуры, изучение ее свойств - включает в себя:**

\*Изучение свойств колоний. Данная процедура включает в себя изучение поведения бактерий, насколько быстро они размножаются, как приспособливаются и т.д. В том случае, если в одной колонии образовалось еще несколько других, то необходимо изучить свойства каждой.

\*Чистая культура. Здесь каждую из колоний помещают в специально определенную под нее емкость и наблюдают за тем, что произойдет дальше.

**\* Третий этап - детальное исследование бактериальных клеток - включает в себя:**

\*Измерение уровня роста и чистоты культуры. В зависимости от того, насколько быстро произошло размножение, а также, не появились ли из этой другие культуры, можно определить семейство бактерий.

\*Проверка на антибиотики. После того, как специалист точно смог определить тип культуры, он должен проверить ее на реакцию на те или иные антибиотики.

# Показания

**Бактериологический метод в кардиологии применяется для диагностики:**

- \* 1. бактериального эндокардита, миокардита, перикардита
- \* 2. установления активности ревматической лихорадки

# Материал

**Материалом для исследования служат:**

- \* 1. Кровь
- \* 2. Мазок из носоглотки и зева

# Правила забора материала

- \* материал берут непосредственно из очага инфекции или исследуют соответствующее отделяемое;
- \* количество материала должно быть достаточным для проведения исследования и его повторения в случае необходимости;
- \* материал берут по возможности в начальном периоде болезни, так как именно в этот период возбудители выделяются чаще, их больше, они имеют более типичную локализацию;
- \* материал берут до начала антимикробной химиотерапии или через определенный промежуток времени после приема антибактериального препарата, необходимый для его выведения из организма;

- \* следует предупредить возможность попадания в материал антимикробных препаратов (дезинфектанты, антисептики, антибиотики);
- \* транспортировку материала в лабораторию следует проводить в максимально короткие сроки, в условиях, исключающих гибель неустойчивых видов микробов, или помещать его в специальные транспортные среды;
- \* при транспортировке должны соблюдаться все правила биологической безопасности;
- \* к материалу прилагают сопроводительный документ, содержащий основные сведения, необходимые для проведения микробиологического исследования (фамилия, имя, отчество больного, номер истории болезни, клинический диагноз и т.д.).

# Бактериальный эндокардит

- \* У больных с предположением на бактериальный эндокардит целесообразно производить посевы крови не менее 5 раз в течение 48 ч. Посевы делают на различные среды и довольно редко выделяют на одной культуре все «причинные» бактерии, которые могут вызывать эндокардит. Обычно выделяют только один вид бактерий и это можно считать большим успехом.
- \* В связи с этим при развившейся клинической картине отрицательные посевы крови не должны успокаивать врача, так как наиболее распространенными методами исследования крови можно получить отрицательный результат более чем в 50 % случаев.
- \* Процент выявления гемокультуры зависит от техники культивирования микроба, момента и правильности взятия крови в период развития лихорадки число положительных результатов увеличивается. Если кровь исследуется на фоне антибиотикотерапии или сразу после нее, то посевы, как правило, роста не дают. При выявлении возбудителя необходимо определить его чувствительность к антибиотикам.

# Выделяемые возбудители

Наиболее часто выявляли гемолитический стафилококк, стрептококки, энтерококки, другие бактерии встречаются реже.

- \* 1. Стафилококки: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*
- \* 2. Стрептококки: *Streptococcus Viridans*, *S.bovis*, *S.pneumoniae*, *S.pyogenes*
- \* 3. Энтерококки: *Enterococcus faecalis* и *E.faecium*.
- \* 4. Грамотрицательные бактерии: *Haemophilus influenzae*, *H.parainfluenzae*, *H.aerophilus*
- \* 5. Грибы рода *Candida spp*.
- \* 6. Редкие возбудители инфекционного эндокардита, не растущие на обычных средах или требующие серологической диагностики относят: ***Bartonella spp*, *Chlamydia spp*, *Brucella spp*, *Legionella spp*, *Coxiella burnetti*.**

# Интерпретация результатов

- \* Количественный метод – подсчитывают количество колоний

Степень	Характеристика
I	Очень скудный рост - рост только на жидких средах; на плотной питательной среде рост отсутствует.
II	На плотной питательной среде рост до 10 колоний микроорганизмов определенного вида.
III	На плотной питательной среде рост от 10 до 100 колоний.
IV	На плотной питательной среде рост более 100 колоний.

В случае роста условно-патогенных микроорганизмов I и II степени роста чаще всего свидетельствуют о загрязнении, III и IV степени роста - об этиологической роли данного микроорганизма в воспалительном процессе.

## Метод серийный разведений

Из транспортной среды, содержащей биоматериал берется 1 мл, который последовательно разбавляется в 10 раз с посевом в пронумерованные пробирки с питательной средой. Та пробирка, в которой прекращается рост микроорганизмов считается максимальной границей количества микроорганизмов в пробе. Для примера количество концентрация микроорганизмов в нижеприведенной таблице составляет  $10 \times 6$

№	$10 \times 1$	$10 \times 2$	$10 \times 3$	$10 \times 4$	$10 \times 5$	$10 \times 6$	$10 \times 7$	$10 \times 8$	$10 \times 9$
рост	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Этот же метод серийных разведений применяется для определения чувствительности к антибиотикам (определяется минимальная ингибирующая концентрация)

## Метод подсчета колоний под микроскопом

Метод является ориентировочным и заключается в подсчете колоний под микроскопом под увеличение 10 x в поле зрения с последующей интерпретацией по сравнительной таблице.

Количество колоний	Концентрация в КОЕ/мл
1	10 x 3
1-5	10 x 4
5-15	10 x 5
>15	10 x 6

# Для определения чувствительности к антибиотикам микроорганизмам применяют следующие методы:

## Метод стандартных дисков

В чашки с питательной средой засевают микроорганизмы, к которым необходимо определить чувствительность к антибиотикам. На поверхность среды помещают стандартные диски, пропитанные растворами антибиотиков в различных концентрациях. Антибиотик проникает в питательную среду и вызывает прекращение роста чувствительного к нему микроорганизма. Измеряя диаметр зоны задержки роста, вычисляют уровень чувствительности микроорганизма к данному антибиотику.

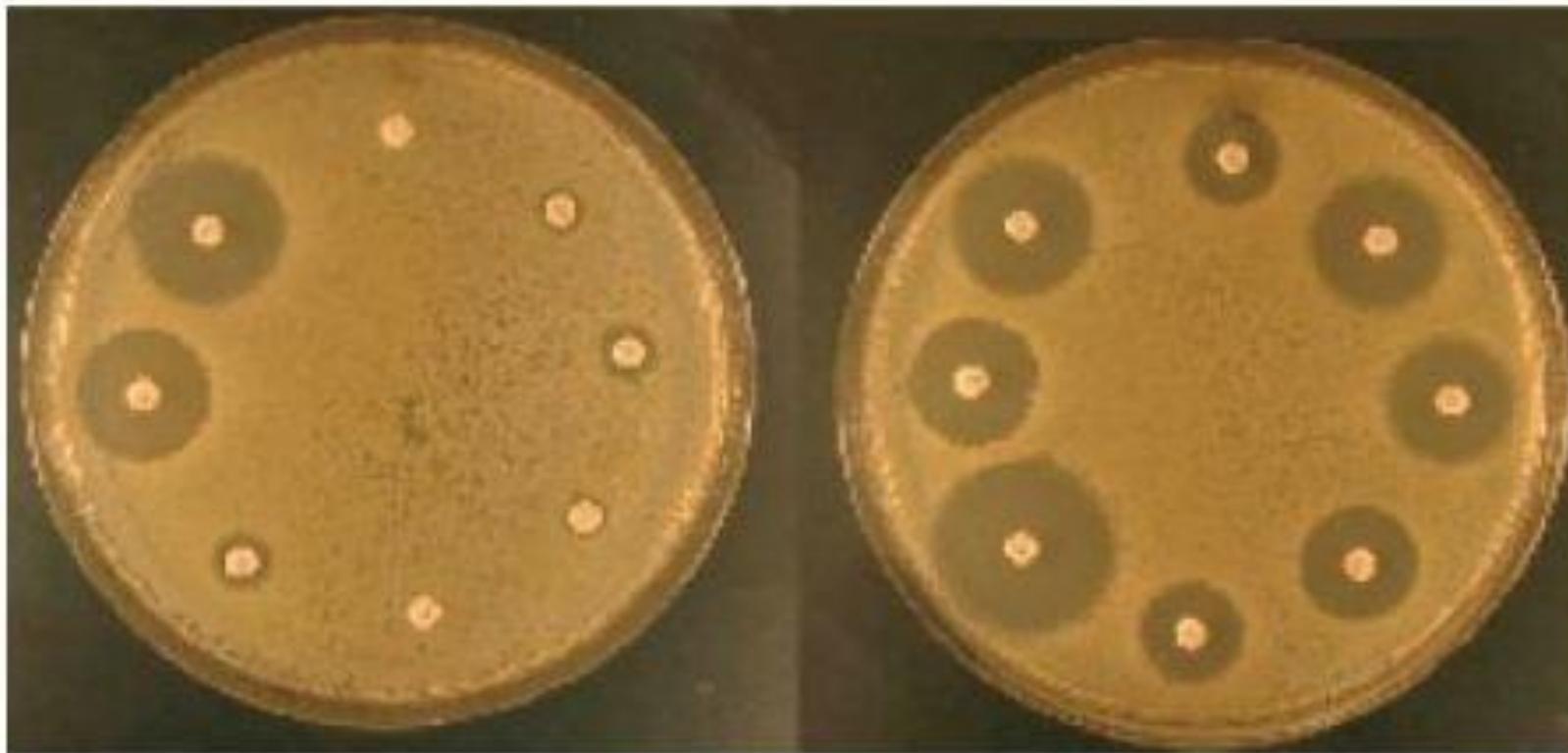
## Диффузионный метод (E-тест)

При этом методе используют полоски из бумаги, пропитанные различными концентрациями антибиотиков. Полоски помещают в питательную среду и по изменению зоны роста определяется уровень чувствительности микроорганизма к антибиотику.

## Метод серийных разведений

Сущность метода описана выше. Является максимально точным из всех предложенных методов.

# Метод стандартных дисков



*Антибиотикограмма*

# Пример:

Таблица: альтернативный пример результатов бак-посева с выявлением эффективных антибиотиков

№	Микроорганизм	Результат КОЕ/мл
1.	Streptococcus Гем гр.В	$5 \cdot 10^4$
2.	Lactobacillus spp.	$1 \cdot 10^5$

## Определение чувствительности к антибиотикам

### Streptococcus Гем гр.В

№	Наименование	Зона	Чувств.	№	Наименование	Зона	Чувств.
1.	Ампициллин (10 мкг)	28	S	7.	Эритромицин (15 мкг)	29	S
2.	Ванкомицин (30 мкг)	20	S	8.	Цефотаксим (30 мкг)	23	R
3.	Клиндамицин (2 мкг)	27	S	9.	Рифампицин (5 мкг)	18	I
4.	Левифлоксацин (5 мкг)	28	S	10.	Линезолид (30 мкг)	20	R
5.	Доксциклин (30 мкг)	24	S	11.	Моксифлоксацин (5 мкг)	26	S
6.	Ко-тримоксазол (1,25 мкг + 23,75 мкг)	26	S	12.	Оксациллин (1 мкг)	25	S

**Заключение:** Из исследуемого материала выделен бета-гемолитический стрептококк группы В, количество лактобацилл соответствует норме.

R - устойчивый

S - чувствительный

I - умеренно-устойчивый

# Преимущества и недостатки

**Преимущества** бактериологического посева являются:

- \* Высокая специфичность метода (то есть перекрестных ложных реакций не наблюдается).
- \* Возможность исследовать абсолютно любую биологическую жидкость человека.
- \* Лечебная цель – определение чувствительности выявленного микроба к тому или иному лечебному средству (антибиотикограмма), что позволяет с достаточно высокой точностью проводить лечебные назначения.

**Недостатки** бактериологического посева:

- \* Длительность получения результата.
- \* Высокие требования к забору материала.
- \* Определенные требования к квалификации персонала бактериологических лабораторий.

## 2. Иммунологический метод

**Иммунологические методы исследования** — диагностические методы исследования, основанные на специфическом взаимодействии антигенов и антител. К ним относят серологические реакции:

- \* реакции агглютинации
- \* реакции преципитации
- \* реакции нейтрализации
- \* реакции с участием комплемента
- \* реакции с использованием меченых антител или антигенов
- \* реакция агглютинации хорошо выявляет IgM-антитела, но менее чувствительна для определения IgG-антител.
- \* реакции связывания комплемента и гемолиза, которые требуют участия комплемента, не выявляют IgA-антитела и IgE-антитела.



Самый распространенный и доступный иммунологический метод в наши дни: **иммуноферментный анализ (ИФА)**.

**Суть метода** заключена в соединении компонентов реакции антиген-антитело с измеряемой ферментной меткой. Антигены или антитела, вступающие в реакцию, метятся ферментом. По превращению субстрата ферментом можно судить о количестве вступившего во взаимодействие компонента реакции антиген-антитело.

**К основным достоинствам** метода ИФА относится его высокая чувствительность, что дает возможность определения иммуноглобулинов в разнообразных биологических жидкостях, быстрое проведение анализа, возможность автоматизации процесса, а также простота и дешевизна. По чувствительности ИФА сопоставим с РИА, но не требует применения радиоактивных изотопов.

**Постановка.** В качестве твердой фазы чаще всего используются полистироловые планшеты с сорбированными на них антигенами или антителами. Определение антител к какому-либо антигену проводят следующим образом:

- \* 1) исследуемую жидкость вносят в лунки планшета с сорбированным на них антигеном;
- \* 2) во время инкубации антитела связываются с антигеном;
- \* 3) планшет отмывают от несвязавшихся антител и добавляют антитела к иммуноглобулинам (вторые антитела), меченные ферментом;
- \* 4) планшет вновь отмывают, добавляют субстрат фермента и хромоген (вещество, меняющее окраску в процессе химической реакции);
- \* 5) под действием продукта ферментативной реакции хромоген меняет окраску. Чем больше меченных ферментом вторых антител связывается с комплексами антиген-антитело, тем выше активность фермента и интенсивность окраски раствора. Концентрацию антител в пробе определяют спектрофотометрически - по оптической плотности окрашенного раствора.

# Варианты реакции ИФА



антитело

образование комплекса  
антиген - антитело



анти-человеческий  
IgG конъюгат

связывание с конъюгатом



хромогенный  
субстрат

энзимная реакция  
окрашивания

# Показания

Иммунологические реакции в кардиологии применяются при:

- \* 1. Ревматических заболеваниях
- \* 2. Бактериальном эндокардите, миокардите, перикардите
- \* 3. Предоперационном комплексном обследовании перед пересадкой органов

# Материал

**Материалом для исследования служат:**

- \* 1. Кровь
- \* 2. Мазок из носоглотки и зева

# Подготовка пациента

- \* за 24 часа до исследования необходимо исключить прием алкоголя и курение;
- \* сдавать кровь следует натощак;
- \* избегать тяжелых физических нагрузок;
- \* пребывать в спокойном состоянии;
- \* избегать нервного напряжения;
- \* сдавать кровь на ИФА не ранее, чем через 10 дней после отмены лекарств;
- \* предупредить врача о приеме необходимых лекарств.

# Интерпретация результатов

- \* Анализ крови на антитела при помощи ИФА имеет 2 модификации – качественное и количественное определение. **При качественном** определении антител результат может быть положительным (антитела выявлены, что указывает на возможное наличие патологического процесса, вызванного возбудителем инфекции) или отрицательным (антител нет, что свидетельствует об отсутствии инфекционного процесса).
- \* *Отсутствие антител не всегда является стопроцентным показателем отсутствия инфекционного процесса. Это связано с тем, что после заражения антитела образуются не сразу, а в течение определенного периода времени (минимум около 2-х недель). Поэтому для подтверждения отсутствия инфекции проведение ИФА может повторяться через некоторое время.*

\* **При количественном ИФА** выполняется определение титра (активности) антител, а также их классов. В большинстве случаев для диагностики инфекционных заболеваний проводится определение антител класса IgG и IgM, которые образуются в организме через различные промежутки времени после инфицирования, поэтому расшифровка результата анализа может иметь несколько значений. В бланке результата этого исследования указывают позитивный (+) либо негативный (-) результат наличия каждого класса иммуноглобулинов

IgM	IgG	IgA	Расшифровка
—	—	—	Иммунитет к инфекции отсутствует
—	+	—	Имеется поствакцинальный или постинфекционный иммунитет
+	-/+	-/+	Острая инфекция
+	+	+	Обострение хронической инфекции
—	+/-	+/-	Наличие хронической инфекции

## **Диагностика различных аутоиммунных заболеваний методом ИФА производится посредством исследования:**

- \* антинуклеарных тел;
- \* антител к двухспиральной ДНК;
- \* антител к растворимым нуклеарным антигенам (ЕНА скрин);
- \* антикардиолипиновых антител;
- \* IgG к цитрулиновому пептиду;
- \* ревматоидного фактора;
- \* С-реактивного белка;
- \* аутоантител к цитоплазматическим антигенам нейтрофилов (ANCA скрин)

\* **Иммунологические анализы** при ревматизме показывают повышение титра антистрептогиалуронидазы, антистрептолидазы (АСЛО), антистрептокиназы, содержание иммуноглобулинов (в основном иммуноглобулина М и иммуноглобулина G). Регистрируется повышение реакции бласттрансформации лимфоцитов, снижение числа Т-лимфоцитов, появление циркулирующих иммунных комплексов и С-реактивного белка.

# Преимущества метода ИФА

Анализ крови методом ИФА характеризуется рядом преимуществ:

- \* высокой точностью;
- \* возможностью проведения ранней диагностики инфекционного процесса;
- \* высоким уровнем унификации;
- \* коротким периодом времени, необходимым для получения результата;
- \* удобством в работе;
- \* автоматизацией всех этапов исследования;
- \* относительно небольшой стоимостью.

# Заключение

- \* Данные методы исследования не являются широко применяемыми, рутинными методами исследований в кардиологии. Они должны быть обоснованы, применяться по показаниям, поскольку являются дорогостоящими процедурами. Тем не менее они являются диагностически значимыми, т.к. позволяют определить специфический возбудитель того или иного заболевания и влияют на выбор этиотропной терапии.

# Список литературы

- \* 1. <http://diagnozlab.com/analysis/bacteriological/bakteriologicheskij-metod-issledovaniya-v-mikrobiologii-vazhnost-metoda-i-osnovnye-etapy.html>
- \* 2. [http://vmede.org/sait/?page=1&id=Mikrobiologija\\_3verev\\_2010\\_t2&menu=Mikrobiologija\\_3verev\\_2010\\_t2;wap](http://vmede.org/sait/?page=1&id=Mikrobiologija_3verev_2010_t2&menu=Mikrobiologija_3verev_2010_t2;wap)
- \* 3. [http://www.serdechno.ru/bakterial\\_endokard/diagnostika/bakteriologichesk/](http://www.serdechno.ru/bakterial_endokard/diagnostika/bakteriologichesk/)
- \* 4. <http://www.wjtoday.ru/ifa-analiz-krovi/>
- \* 5. <https://prof-med.info/laboratornye-issledovaniya/113-ifa>