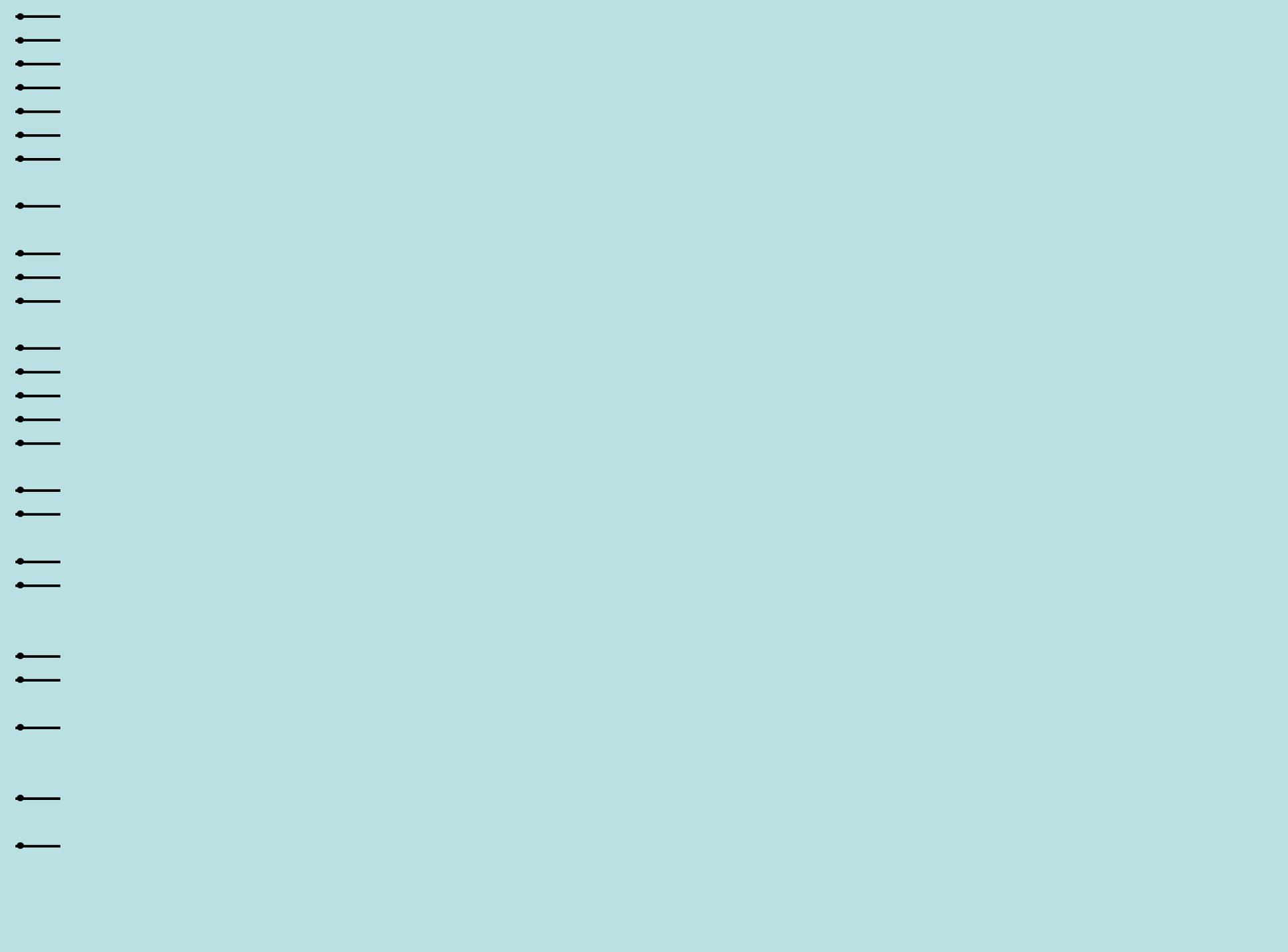


# **ПРАКТИЧЕСКИЕ НАВЫКИ**

**к аттестации студентов 5  
курса по разделу  
«Инфекционные болезни»**









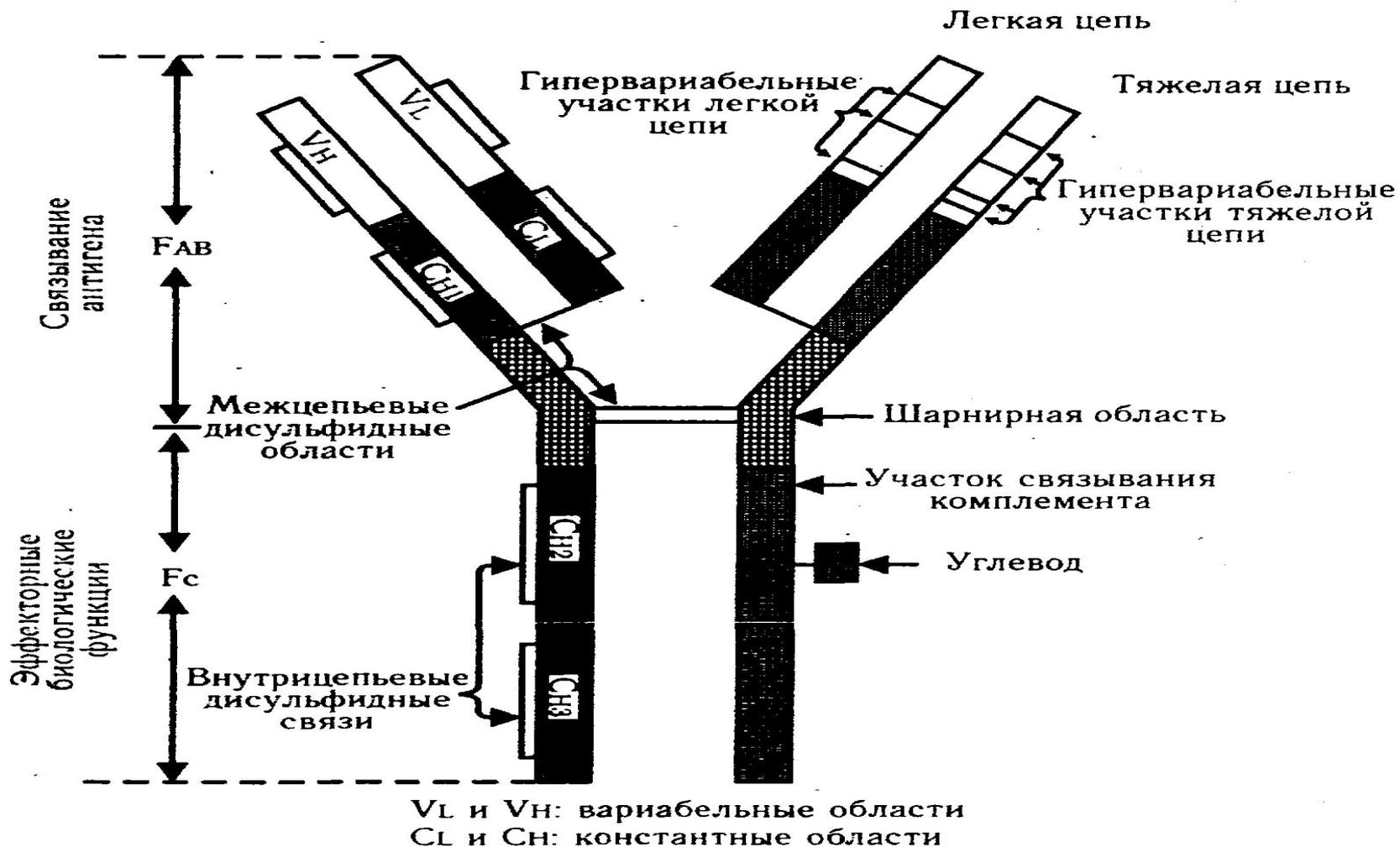
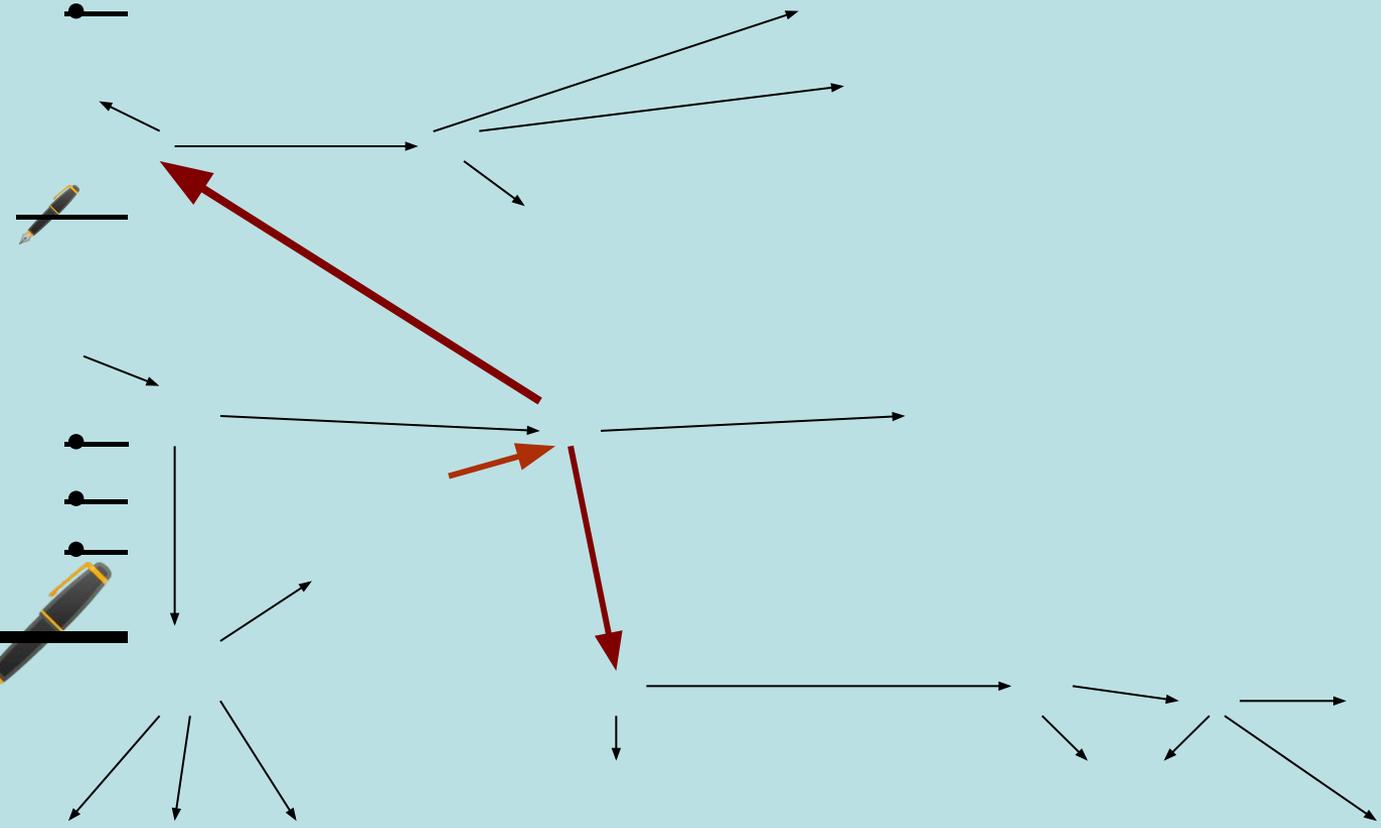


Рис. 64. Структура молекулы IgG. Показана локализация участков, ответственных за различные функции (по Д. Джеске, Дж. Кеппе, 1987).





Показатели иммунологического статуса					Пределы нормальных колебаний			
Лейкоциты	5700		*10 <sup>6</sup> / л		3,5 - 8,8 * 10 <sup>9</sup> / л			
Лимфоциты	43	%	2451	кл/мкл	19-37	%	1200-3000	кл/мкл
<b>T-лимфоциты</b>								
CD 3	68	%	1666,68	кл/мкл	55-85	%	800-2200	кл/мкл
CD 4	47	%	1151,9	кл/мкл	30-50	%	600-1600	кл/мкл
CD 8	16	%	392,16	кл/мкл	15-30	%	300-800	кл/мкл
<b>B-лимфоциты</b>								
CD 19		%		кл/мкл	10-25	%	300-900	кл/мкл
CD 21				кл/мкл	10-30	%	100-900	кл/мкл
Натуральные киллеры CD16	16	%	392,1	кл/мкл	6-25	%	70-750	кл/мкл
Иммунорегуляторный индекс CD4/CD8	2,9				1,0-2,5			
IgA	1	г/л			0,6-4,5	г/л		
IgM	1,2	г/л			0,4-2,4	г/л		
IgG	12,8	г/л			6,0-20,0	г/л		
IgE		Ке/л			20-100	Ке/л		
фагоцитоз с латексом	79	%	2521,6	кл/мкл	30-90	%	600-5200	кл/мкл
<b>НСТ-тест</b>								
<b>Спонтанный</b>		%			1-12	%	СЦК	0,1-0,15
<b>Стимул.зимозаном</b>		%			40-80	%	СЦК	0,5-1,5
<b>Гемолитическая активность</b>								
	78				СН50	(45-130 СН 50)		

Показатели иммунологического статуса				Пределы нормальных колебаний				
Лейкоциты	5000		*10 <sup>6</sup> /л		3,5 - 8,8 * 10 <sup>9</sup> / л			
Лимфоциты	31	%	1550	кл/мкл	19-37	%	1200-3000	кл/мкл
Т-лимфоциты								
CD 3	71	%	1100,5	кл/мкл	55-85	%	800-2200	кл/мкл
CD 4	51	%	790,5	кл/мкл	30-50	%	600-1600	кл,мкл
CD 8	20	%	310	кл/мкл	15-30	%	300-800	кл/мкл
В-лимфоциты								
CD 19		%		кл/мкл	10--25	%	300-900	кл/мкл
CD 21				кл/мкл	10-30	%	100-900	кл/мкл
Натуральные								
киллерыCD16	12	%	186	кл/мкл	6--25	%	70-750	кл/мкл
индекс CD4/CD8	2,6				1,0-2,5			
IgA	3,5	г/л			0,6-4,5	г/л		
IgM	0,8	г/л			0,4-2,4	г/л		
IgG	13,5	г/л			6,0-20,0	г/л		
IgE		Ке/л			20-100	Ке/л		
фагоцитоз с латексом	42	%	1410	кл/мкл	30-90	%	600-5200	кл/мкл



Показатели иммунологического статуса					Пределы нормальных колебаний			
Лейкоциты	6000		*10 <sup>6</sup> /л		3,5 - 8,8 * 10 <sup>9</sup> / л			
Лимфоциты	33	%	1980	кЛ/мкЛ	19-37	%	1200-3000	кЛ/мкЛ
<b>Т-лимфоциты</b>								
CD 3	65	%	1287	кЛ/мкЛ	55-85	%	800-2200	кЛ/мкЛ
CD 4	20	%	396	кЛ/мкЛ	30-50	%	600-1600	кЛ,мкЛ
CD 8	58	%	1148,4	кЛ/мкЛ	15-30	%	300-800	кЛ/мкЛ
<b>В-лимфоциты</b>								
CD 19		%		кЛ/мкЛ	10--25	%	300-900	кЛ/мкЛ
CD 21				кЛ/мкЛ	10-30	%	100-900	кЛ/мкЛ
киллерыCD16	12	%	237,6	кЛ/мкЛ	6--25	%	70-750	кЛ/мкЛ
индекс CD4/CD8	0,3				1,0-2,5			
IgA	2,2	г/л			0,6-4,5	г/л		
IgM	1,4	г/л			0,4-2,4	г/л		
IgG	16,5	г/л			6,0-20,0	г/л		
IgE		Ке/л			20-100	Ке/л		
Фибриноген в сыворотке	0,6	%	2686,4	кЛ/мкЛ	30-90	%	600-5200	кЛ/мкЛ

Анамнез заболевания: болен 2-е сутки. Заболел остро – головная боль, многократная рвота приносящая облегчение, температура 39.

Эпид. Анамнез: спокойный.

Анамнез жизни: перенесенные заболевания: ветряная оспа, пневмония в 12 лет, дизентерия в 1994г., ОРЗ, гайморит.

Клиника	Приемный статус	5-6 сутки терапии	11 сутки терапии	Выписка
Жалобы:	На головную боль, пульсирующего характера в височных областях, рвоту, температура 38,4, озноб.	Незначительную слабость, боль в поясничной области.	Нет	нет
Объективно:	Состояние средней тяжести. В сознании, адекватна. Кожные покровы бледные, сыпи нет. Язык обложен. В легких везикулярное дыхание. Хрипов нет. Тоны сердца ясные ритмичные. Живот мягкий, б/болезненный. Менингеальные симптомы отр. <b>Положение вынужденное на боку с приведенными ногами.</b>	Состояние удовл. РЗМ (+). Надавливание на глазные яблоки б/б По внутренним органам и системам без патологии, симптом Кернига, Брудзинского отр.	Состояние удовл. Менингеальные знаки отр. По внутренним органам и системам без патологии.	
Показатель	До начала терапии	5-6 сутки терапии	11 сутки терапии	Выписка
Кровь (общ.анализ):				
Эритроциты $10^{12}/л$	4,8			
Гемоглобин г/л	144			
Ц.П.	1,0			
Лейкоциты $10^9/л$	13,2			
Нейтрофилы, лимфоциты %	71,24			
Тромбоциты % <sub>0</sub>	50			
СОЭ мм/ч	2			
Моча:				

<b>Ликвор:</b>	
<b>Прозрачность</b>	<b>Опалесцирующий</b>
<b>Цвет</b>	<b>Бесцветный</b>
<b>Давление</b>	
<b>Цитоз кл. в мл<sup>3</sup></b>	<b>325</b>
<b>Нейтрофильный %</b>	<b>11</b>
<b>Лимфоцитарный %</b>	<b>89</b>
<b>Белок ‰</b>	<b>0,66</b>
<b>Сахар ммоль/л</b>	<b>5,0</b>
<b>Выделение бак. культуры (серологический)</b>	<b>Нет роста</b>

Анамнез заболевания С 02.2002 отмечалась субфебрильная Т(37,5-38). Никуда не обращался.3 дня назад вернулся из командировки с Т=38,5, жаловался на слабость , рвоту. 21.08-сильнейшая головная боль, рвота, потеря сознания. В командировке был госпитализирован в больницу , со слов что-то с почками .Доставлен СП из ГБ 1..

Эпид. Анамнез: Во время командировки работал в лесу..

Анамнез жизни: страдает ГБ с15 лет.Рабочее АД 180/100 мм.рт.ст

Клиника	Приемный статус	5-6 сутки терапии	11 сутки	Выписка
Жалобы:	Не предъявляет, т.к контакту не доступен в связи с тяжелым состоянием			
<b>Объективно:</b>	<p>Рс=110,АД=140/90,чдд=22 состояние тяжелое .Кома 1.Сопор.Реагирует на болевые раздражители.Глазные яблоки плавающие. Кожные покровы обычной окраски,чистые.В легких жесткое дыхание,хрипов нет.Тоны сердца приглушены ритмичные.С-мы раздражения брюшины отр.Печень по краю реберной дуги. Диурез сохранен. <b>РЗМ (+), с-м Кернига с2-х сторон.</b></p>			
Показатель	До начала терапии	5-6 сутки терапии	11 сутки	Выписка
Кровь (общ.анализ):				
Эритроциты 10 <sup>12</sup> /л	5,2	5,13	5,73	4,94
Гемоглобин г/л	154	173	162	148
Ц.П.	1,0	1,0	1,0	1,0
Лейкоциты 10 <sup>9</sup> /л	19,8	10,1	10,2	6,1
Нейтрофилы, лимфоциты %				
Тромбоциты ‰	40	33		
СОЭ мм/ч	25	34	21	21
Кровь (б.х. анализ):				
АлАТ мм/л	0,68			

<b>Ликвор:</b>			
<b>Прозрачность</b>	<b>Мутная</b>	<b>Мутноватая</b>	<b>Мутноватая</b>
<b>Цвет</b>	<b>Желтоватый</b>		<b>Бесцветная</b>
<b>Давление</b>		<b>Вытекает по каплям</b>	
<b>Цитоз кл. в мл<sup>3</sup></b>	<b>68 000</b>	<b>Подсчету не подлежит</b>	<b>197</b>
<b>Нейтрофильный %</b>	<b>100</b>	<b>85</b>	<b>50</b>
<b>Лимфоцитарный %</b>		<b>15</b>	<b>50</b>
<b>Белок ‰</b>	<b>16,5</b>	<b>0,66</b>	<b>0,33</b>
<b>Сахар ммоль/л</b>	<b>20,5</b>		<b>3,1</b>
<b>Выделение бак. культуры (серологический)</b>	<b>N. Meningitidis</b>		<b>Нет роста</b>

● —

● —

● —

● —

## Приготовление мазка

- Иглой-скарификатором делают достаточно глубокий укол, чтобы капля крови выступила самопроизвольно. Первую каплю крови вытирают насухо стерильной ватой, последующие капли используют для приготовления препаратов.

- Удерживая и слегка сжимая с боков подушечку пальца больного, прикасаются к капле крови чистой поверхностью предметного стекла. Капля крови на стекле должна располагаться ближе к краю. Аналогично готовят второй препарат.

- Предметное стекло укладывают на стол и удерживают между большим и указательным пальцами.

- На поверхность предметного стекла справа от капли крови и рядом с ней ставят шлифовальное стекло под углом  $45^\circ$  и продвигают его до соприкосновения с каплей крови. Когда кровь равномерно распределится по грани шлифовального стекла, быстрым движением шлифовального стекла слева направо, не изменяя угла его наклона, делают мазок. Мазок не должен доходить ни до краев, ни до

## Приготовление толстой капли

- Сняв ватой кровь с грани шлифовального стекла, готовят мазок на втором предметном стекле.

- На поверхность одного из влажных мазков наносят 2 капли крови диаметром по 5 мм, располагая их в нескольких сантиметрах друг от друга. При таких условиях капли растекаются в виде правильных дисков диаметром 1—1,5 см. Подсыхать «толстые капли» должны постепенно на воздухе, без подогрева, в условиях защиты их от повреждения насекомыми. После подсыхания приготовленные таким образом капли крови прочнее фиксируются на стекле и не смываются при окраске. Препараты крови окрашивают без предварительной фиксации по Романовскому—Гимзе.





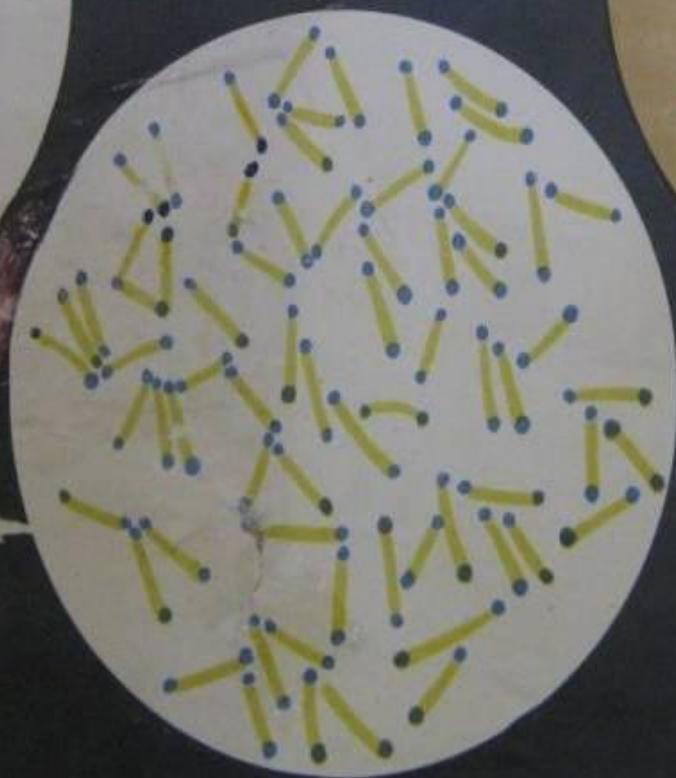
СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ  
(ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР)

U.6

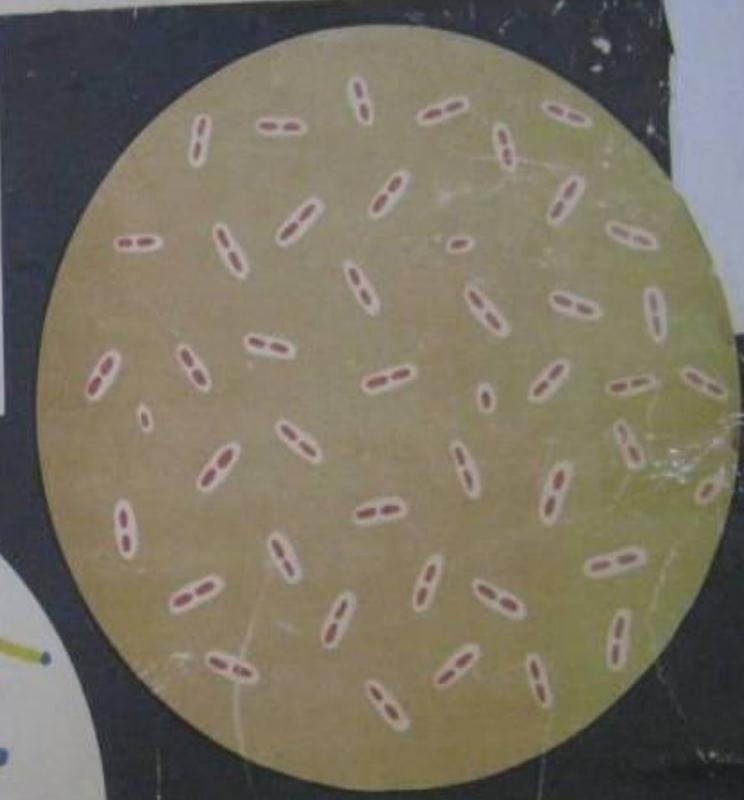
МЕТОД АУЕСКИ



МЕТОД НЕЙССЕРА  
КОРИНЕБАКТЕРИИ ДИФТЕРИИ  
ЗЕРНА ВОЛЮТИНА



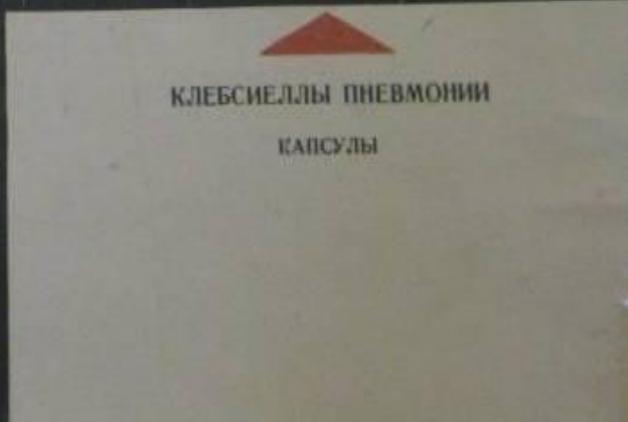
МЕТОД ГИНСА



КЛОСТРИДИИ СТОЛБНЯКА  
СПОРЫ



КЛЕБСИЕЛЛЫ ПНЕВМОНИИ  
КАПСУЛЫ





•

•

•

•

•



**К основным требованиям, предъявляемым к отбору и транспортировке материала для бактериологического исследования, относят:**

- ⦿ взятие материала до начала этиотропного лечения;**
- ⦿ соблюдение условий стерильности при сборе материала;**
- ⦿ техническую правильность сбора материала;**
- ⦿ достаточное количество материала;**
- ⦿ обеспечение температурного режима хранения и транспортировки материала;**
- ⦿ сведение к минимальному промежутка времени между сбором материала и посевом на плотные питательные среды.**



# Вирусологический метод

Вирусологический метод включает два основных этапа: **выделение вирусов и их идентификацию**. Материалами могут быть кровь, другие биологические и патологические жидкости, биоптаты органов и тканей. В слюне могут быть обнаружены вирусы бешенства, эпидемического паротита, простого герпеса. Носоглоточные смывы служат для выделения возбудителей гриппа и других ОРВИ, кори. В смывах с конъюнктивы обнаруживают аденовирусы. Из фекалий выделяют различные энтеро-, адено-, рео- и ротавирусы.

Для выделения вирусов используют культуры клеток, куриные эмбрионы, иногда лабораторных животных. Большинство патогенных вирусов отличается наличием тканевой и типовой специфичности. Для выделения неизвестного возбудителя целесообразно одновременно заражать 3—4 культуры клеток, предполагая, что одна из них может оказаться чувствительной. Наличие вируса в зараженных культурах определяют по развитию специфической дегенерации клеток, т.е. цитопатогенному действию, обнаружению внутриклеточных включений, а также на основе выявления специфического антигена методом иммунофлуоресценции, положительных реакций гемадсорбции и гемагглютинации.

Вирусы идентифицируют с помощью иммунологических методов: реакции торможения гемагглютинации, связывания комплемента, нейтрализации, преципитации в геле, иммунофлуоресценции.

# 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.



# Иммунологический метод

**Иммунологический метод (серологический) включает исследования сыворотки крови, а также других биологических субстратов для выявления специфических антител и антигенов.**

**Классическая серодиагностика основана на определении антител к выявленному или предполагаемому возбудителю.**

**Обнаружения в исследуемой сыворотке крови антител к возбудителю ряда инфекционных болезней недостаточно для постановки диагноза, поскольку оно может отражать наличие постинфекционного или поствакцинального иммунитета, поэтому исследуют «парные» сыворотки крови, первую, взятую в первые дни болезни, и вторую, взятую с интервалом 7—10 дней, оценивают динамику нарастания титра антител. Диагностически значимо увеличение титра антител в исследуемой сыворотке крови не менее чем в 4 раза относительно первоначального уровня -**

**Этот феномен называют *сероконверсией*.**

**При проведении серологических исследований можно установить **изотип антител.****

Известно, что при первой встрече организма человека с возбудителем **в остром периоде болезни выявляют** более быстрое нарастание антител, принадлежащих к **IgM**, уровень которых, достигая максимального значения, затем снижается.

В более поздние сроки болезни повышается количество **IgG-антител**, которые дольше сохраняются и определяются в периоде реконвалесценции.

При **повторной встрече с возбудителем** благодаря иммунологической памяти реакции гуморального иммунитета проявляются более быстрой **продукцией IgG-антител**, а антитела класса М вырабатываются в незначительном количестве.

**Обнаружение IgM-антител свидетельствует о наличии текущего инфекционного процесса, а наличие IgG-антител — о перенесенной в прошлом инфекции или поствакцинальном иммунитете.**

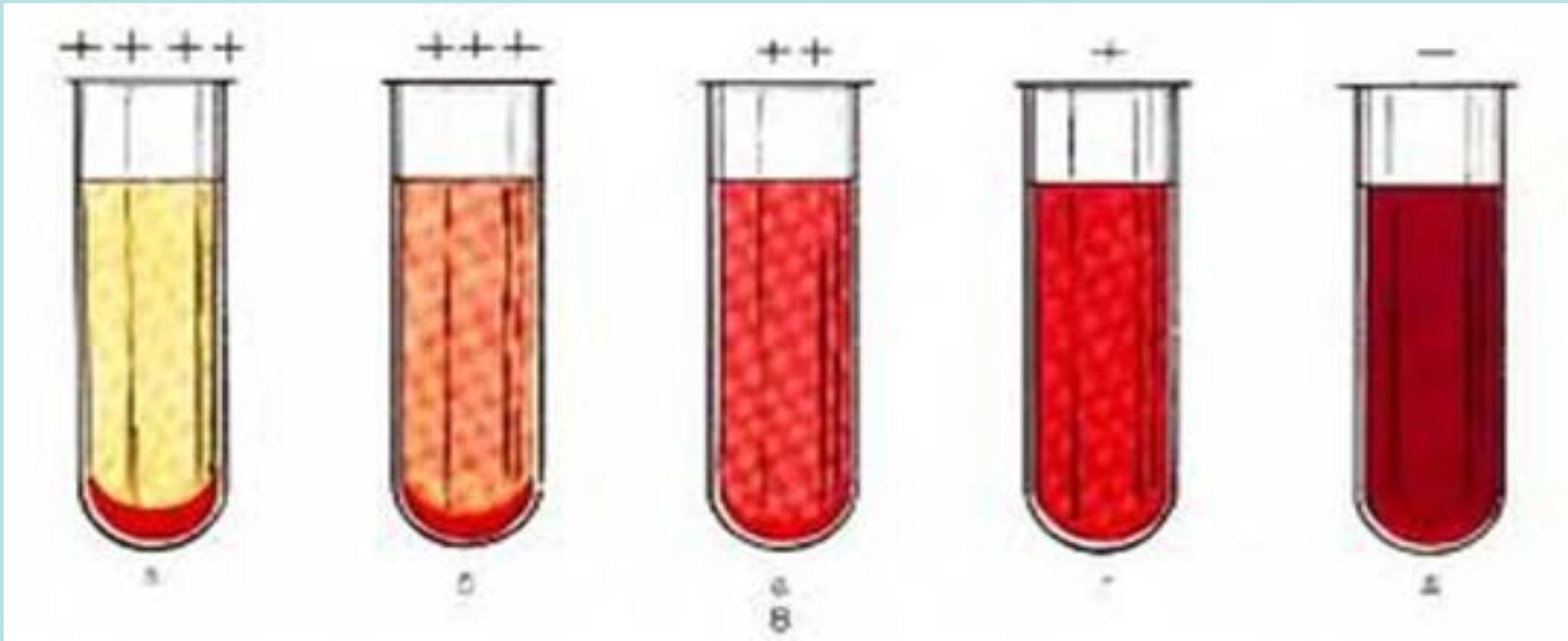
Учитывая особенности первичного и вторичного иммунного ответа, анализ соотношения **IgM- и IgG-антител** позволяет в некоторых случаях дифференцировать стадию инфекционного процесса (**разгар заболевания, реконвалесценция, рецидив**).

**Реакция агглютинации (РА)** основана на применении корпускулярного антигена (взвесь бактерий, сенсibilизированных эритроцитов, частиц латекса и др.), взаимодействующего со специфическими антителами, в результате чего образующийся комплекс антиген — антитело выпадает в виде осадка. Эту реакцию широко применяют в лабораторной практике для серологической диагностики бактериальных инфекций и для идентификации выделенных микроорганизмов.

РА используют для диагностики многих инфекционных болезней: бруцеллеза (реакции Райта, Хеддльсона), туляремии, лептоспироза (РАЛ — реакция агглютинации и лизиса лептоспир), листериоза, сыпного тифа (РАР — реакция агглютинации риккетсий), шигеллеза, иерсиниоза, псевдотуберкулеза и др.



↑  
↑



**Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА)** используют для титрования противовирусных антител в сыворотках крови, а также с целью установления типовой принадлежности выделенных вирусных культур. РТГА можно применить для диагностики тех вирусных инфекций, возбудители которых обладают гемагглютинирующими свойствами.

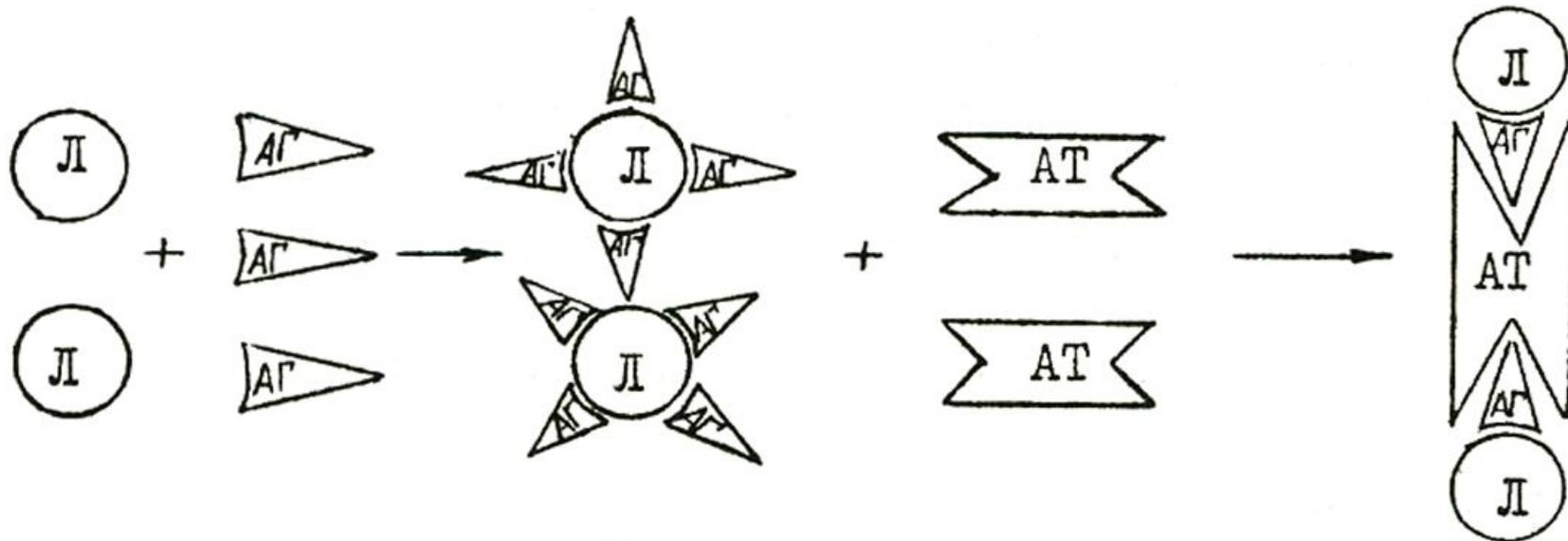
**Принцип метода** состоит в том, что сыворотка, содержащая антитела к конкретному типу вируса, подавляет его гемагглютинирующую активность и эритроциты остаются неагглютинированными

**Реакция торможения (задержки) пассивной гемагглютинации (РТПГА).** В РТПГА участвуют три компонента: иммунная сыворотка, антиген (исследуемый материал) и сенсibilизированные эритроциты.

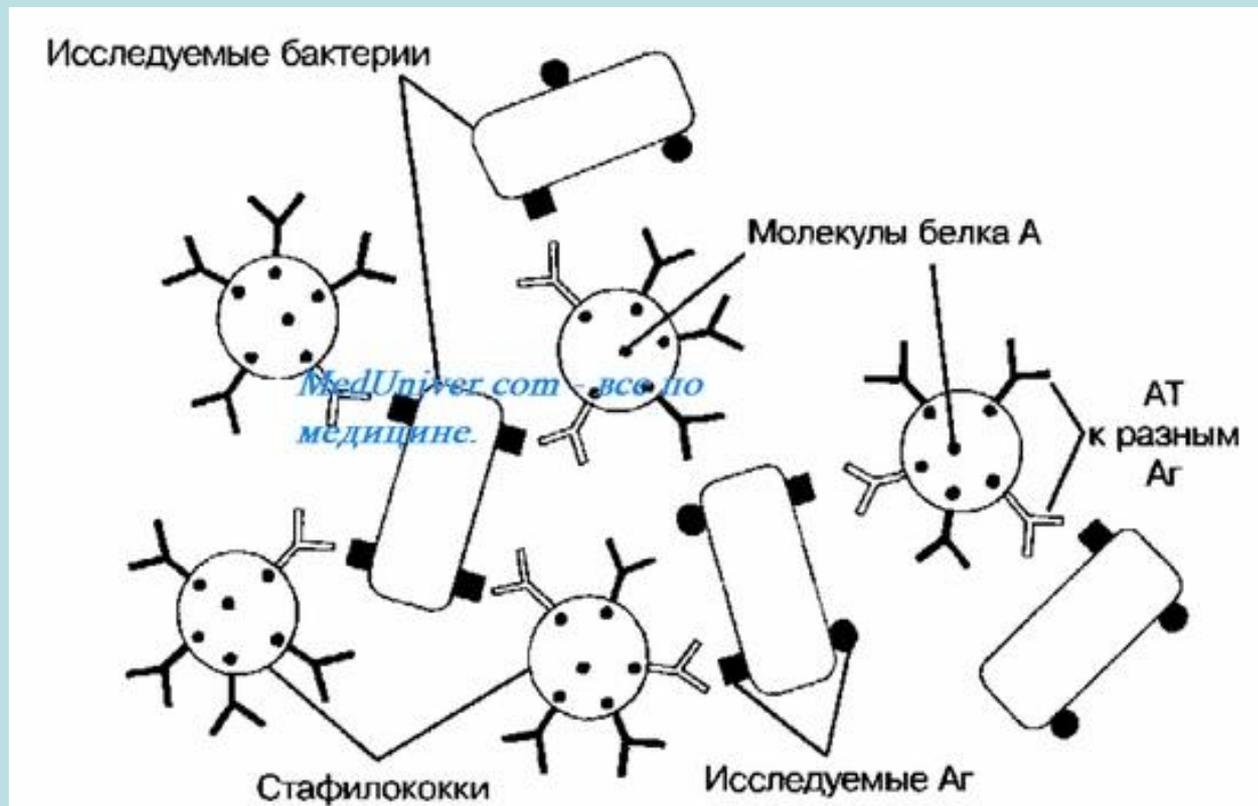
РТПГА применяют для обнаружения микробных антигенов, для количественного их определения, а также для контроля специфичности РПГА.

**Реакция латекс агглютинации (РЛА).** В качестве носителя антител (иммуноглобулинов) используют частицы латекса. РЛА является экспресс-методом диагностики инфекционных болезней, учитывая время проведения (до 10 мин) и возможность обнаружить антиген в небольшом объеме исследуемого материала.

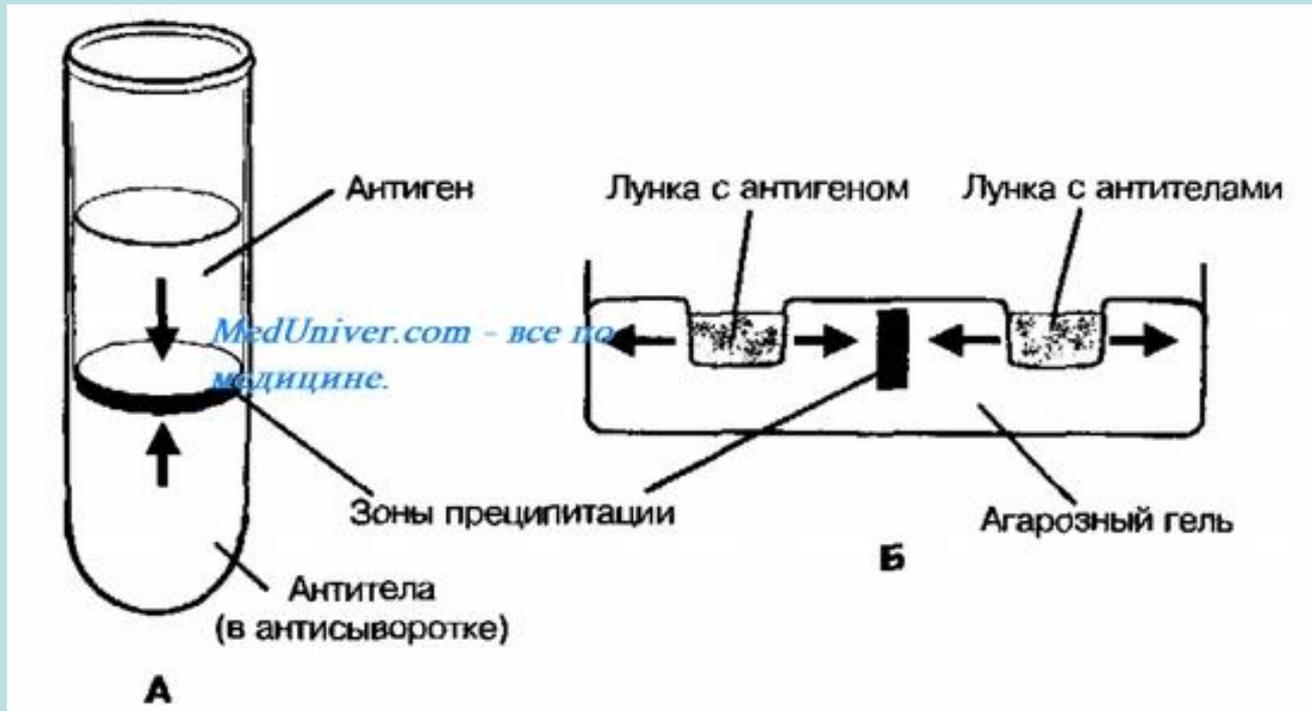
РЛА применяют для индикации антигенов *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* типа b, *Neisseria meningitidis* в цереброспинальной жидкости, выявления стрептококков группы А в мазках из зева, для диагностики сальмонеллеза, иерсиниозов и других заболеваний. Чувствительность метода составляет 1—10 нг/мл, или  $10^3$ — $10^6$  бактериальных клеток в 1 мкл.



**Реакция коаггутинации (РКоА)** основана на способности белка А стафилококков присоединять специфические иммуноглобулины. РКА — метод экспресс-диагностики — служит для выявления растворимых термостабильных антигенов в секретах человека и в составе циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Обнаружение специфических антигенов в составе ЦИК требует их предварительного осаждения из сыворотки крови.



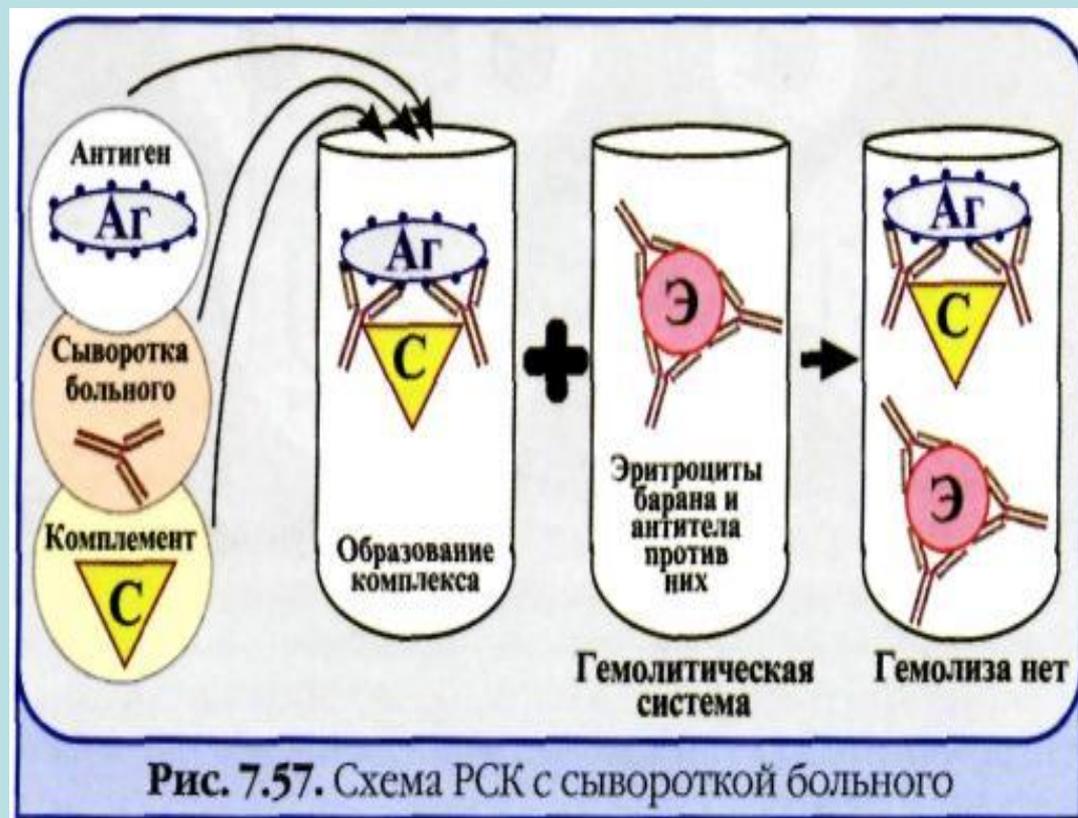
**Реакция преципитации.** В реакции преципитации (РП) в результате взаимодействия антител с высокодисперсными растворимыми антигенами (белки, полисахариды) образуются комплексы с участием комплемента — преципитаты. Это чувствительный тест, используемый для выявления и характеристики разнообразных антигенов и антител. Простейшим примером качественной РП является образование непрозрачной полосы преципитации в пробирке на границе наложения антигена на иммунную сыворотку — реакция кольцепреципитации. Широко применяют различные разновидности РП в полужидких гелях агара или агарозы (метод двойной иммунодиффузии, метод радиальной иммунодиффузии, иммуноэлектрофорез).



**Реакция связывания комплемента (РСК)** основана на феномене гемолиза с участием комплемента, т.е. способна выявлять только комплементсвязывающие антитела.

РСК широко применяют для диагностики многих бактериальных и вирусных инфекций, риккетсиозов, хламидиозов, инфекционного мононуклеоза, протозойных инфекций, гельминтозов. РСК является сложной серологической реакцией, в которой участвуют две системы: исследуемая (сыворотка крови), представленная системой антиген — антитело и комплементом, и гемолитическая (эритроциты барана + гемолитическая сыворотка). Гемолитическая сыворотка представляет собой инактивированную прогреванием сыворотку крови кролика, иммунизированного эритроцитами барана. Она содержит антитела против эритроцитов барана.

Положительный результат РСК — отсутствие гемолиза — наблюдают в случае, если в исследуемой сыворотке содержатся антитела, гомологичные антигену. При этом образовавшийся комплекс антиген — антитело связывает комплемент, а в отсутствие свободного комплемента добавление гемолитической системы не сопровождается гемолизом. В случае отсутствия в сыворотке антител, соответствующих антигену, образования комплекса антиген — антитело не происходит, комплемент остается свободным и сыворотка вызывает гемолиз эритроцитов, т.е. **наличие гемолиза — это отрицательный результат реакции.**

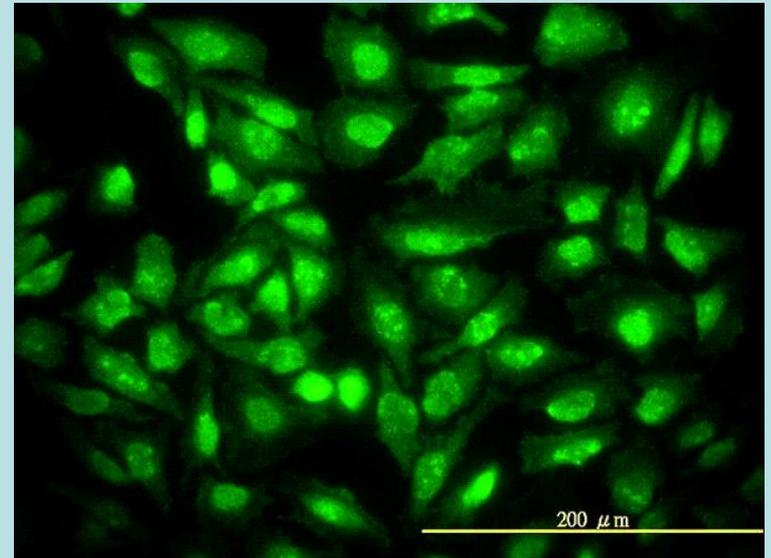


# Иммунофлюоресцентный метод

Иммунофлюоресценция (ИФ) представляет собой люминесценцию биологического объекта в ультрафиолетовом спектре под микроскопом после его предварительной обработки специфическими антителами, меченными флюорохромом.

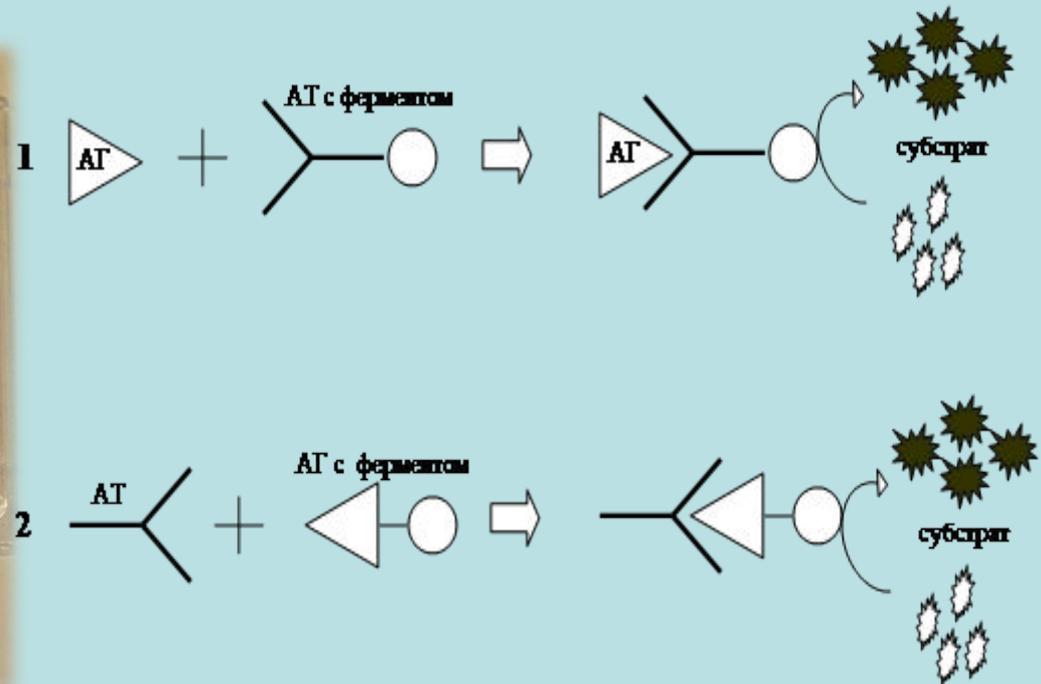
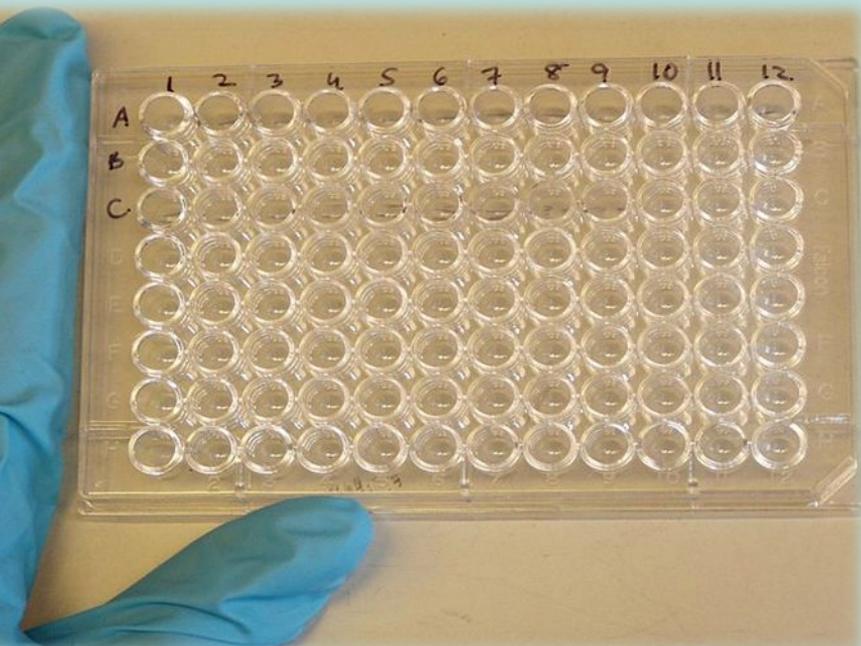
ИФ была разработана Кунсом в 1942 г. и применяется как метод экспрессдиагностики инфекционных болезней.

ИФ — универсальный иммунохимический метод, сочетающий достаточно точный морфологический анализ со специфичностью иммунологических методов.



**Иммуноферментный анализ (ИФА)** проводят в два этапа: первый — взаимодействие антител с антигеном, второй — ферментативная индикация комплекса антиген — антитело за счет появления окрашивания реакционной смеси и регистрации окрашивания визуально либо спектрофотометрическим методом.

Существуют два варианта ИФА: твердофазный и жидкофазный, различающиеся по способу разделения компонентов иммунохимической реакции. Наибольшее распространение получил **твердофазный гетерогенный иммунный анализ - ELISA** (enzyme linked immunosorbent assay). ИФА применяют для двух целей - для определения наличия антигенов возбудителей различных инфекций, но значительно чаще метод ИФА применяется для определения наличия антител классов (IgA, IgM, IgG) к антигенам различных возбудителей болезней. С помощью ИФА можно определить антитела к любой половой инфекции.

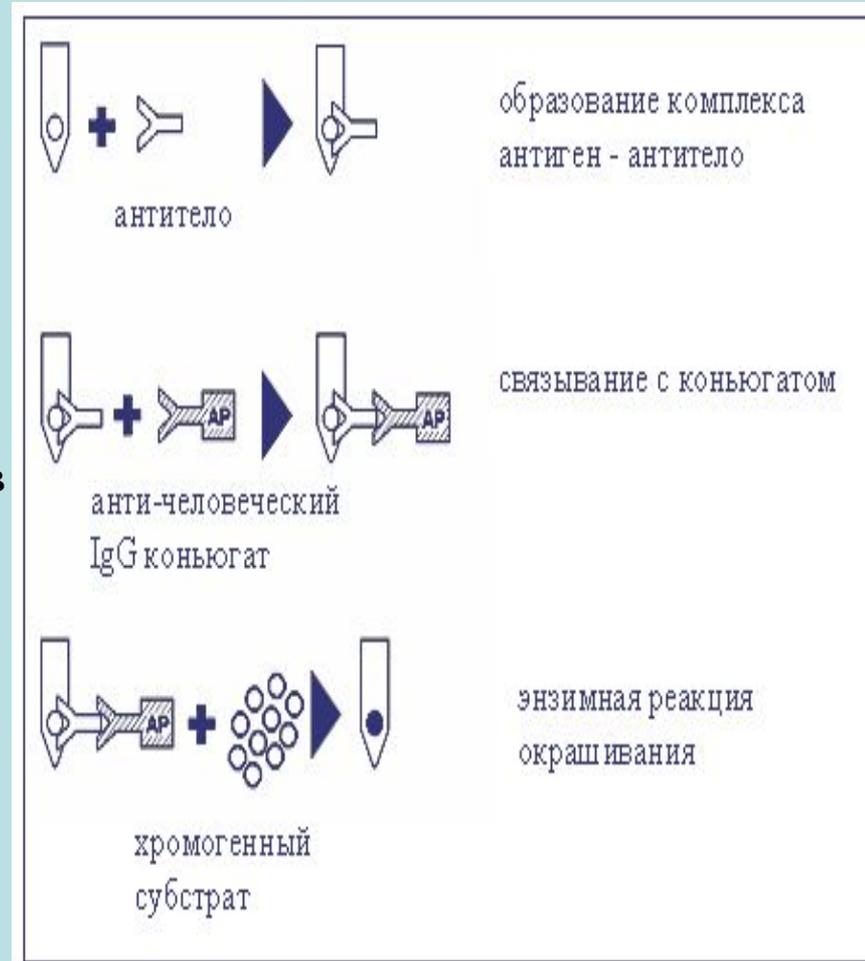


## ИФА обладает существенными

преимуществами:

- высокой чувствительностью, позволяющей определять до 0,05 нг/мл вещества;
- возможностью использования минимальных объемов исследуемого материала (1—2 мкл);
- возможностью инструментального или визуального учета реакции;
- экспрессностью и возможностью автоматизации всех этапов реакции.

ИФА в настоящее время широко используют в практике для диагностики многих инфекционных болезней бактериальной, грибковой этиологии, протозойных инфекций и гельминтозов, но особенно вирусных инфекций, в частности гепатитов А, В, С, D, E, G, ВИЧ-инфекции, герпесвирусных, ротавирусных, аденовирусных, астровирусных, парвовирусных и других инфекций.



# Как интерпретировать результаты ИФА

Стадия заболевания	IgM	IgA	IgG
Первичная фаза (2 недели от инфицирования)	+	-	-
Первичная фаза ( 2,5 — 3 недели от инфицирования)	+	+	-
Первичная фаза ( 3-4 недели от инфицирования)	+	+	+
Обострение хронической фазы ( 2 недели от начала обострения)	-	+	+
Хроническая фаза	-	+/-	+
Прошедшая (излеченная инфекция)	-	-	+
Выздоровление	-	снижение титра в 2-4 раза после успешного лечения	снижение титра в 4-8 раз через 1-1.5 месяца после успешного лечения
Отрицательный результат	-	-	-

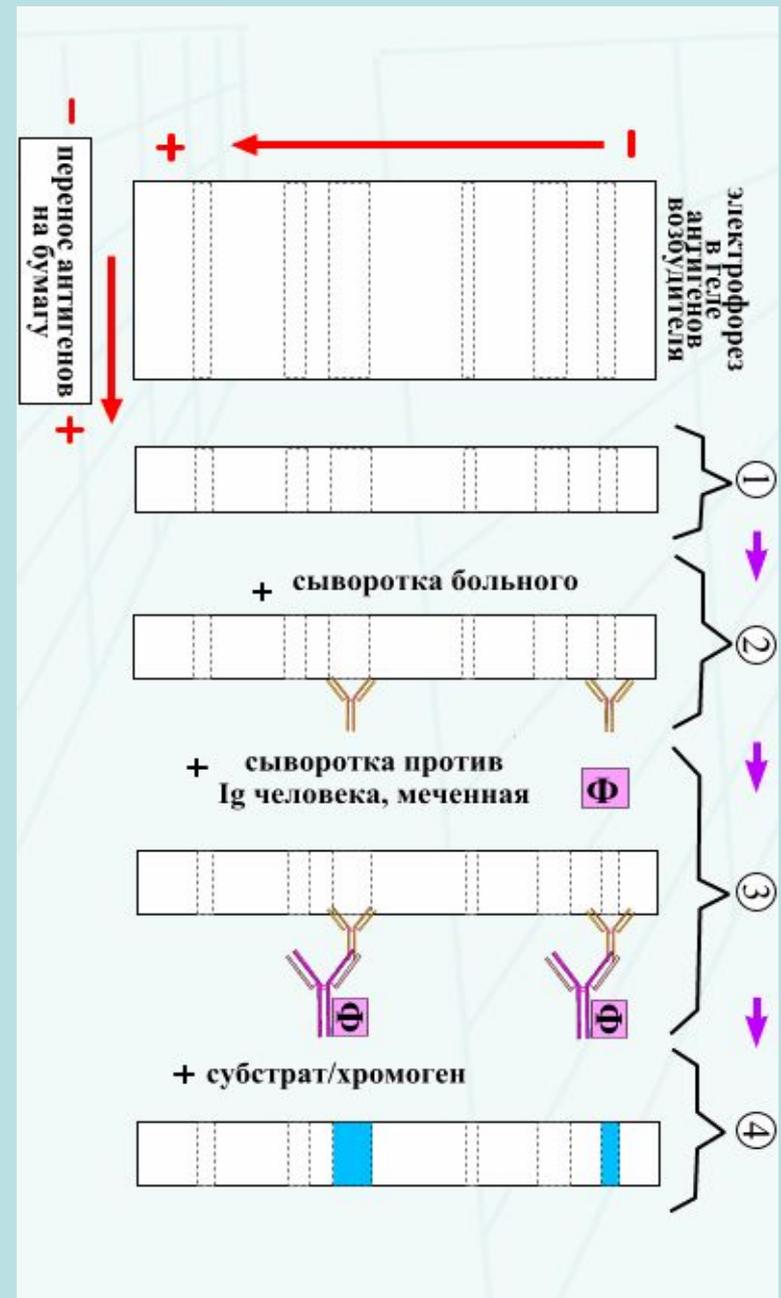
# **Преимущества , которыми располагает ИФА по сравнению с другими методами детекции антигенов и антител:**

- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 
-

# Иммунный блоттинг

Принцип метода иммунного блоттинга состоит в выявлении антител к отдельным антигенам возбудителя.

С помощью этого метода определяют антитела к антигенам ВИЧ (гликопротеинам оболочки вируса, белкам сердцевины и ферментам вируса).

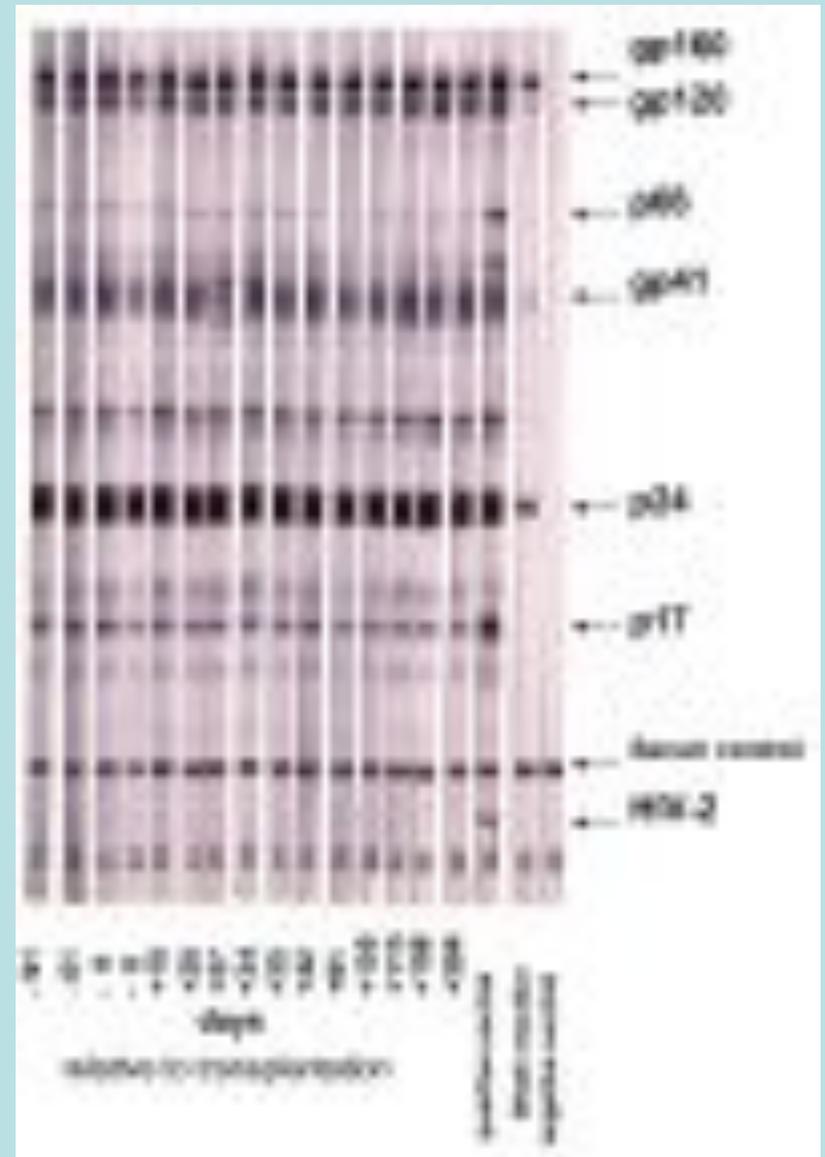


**Результаты иммунного  
блоттинга оценивают как:**

- **положительные,**
- **сомнительные и**
- **отрицательные**

**в зависимости от  
количественного и  
качественного набора  
выявленных антител.**

**Необходимо отметить, что  
иммунный блоттинг уступает  
по чувствительности ИФА, в  
некоторых случаях может  
регистрироваться  
отрицательный результат при  
наличии ВИЧ-инфекции у  
пациента**



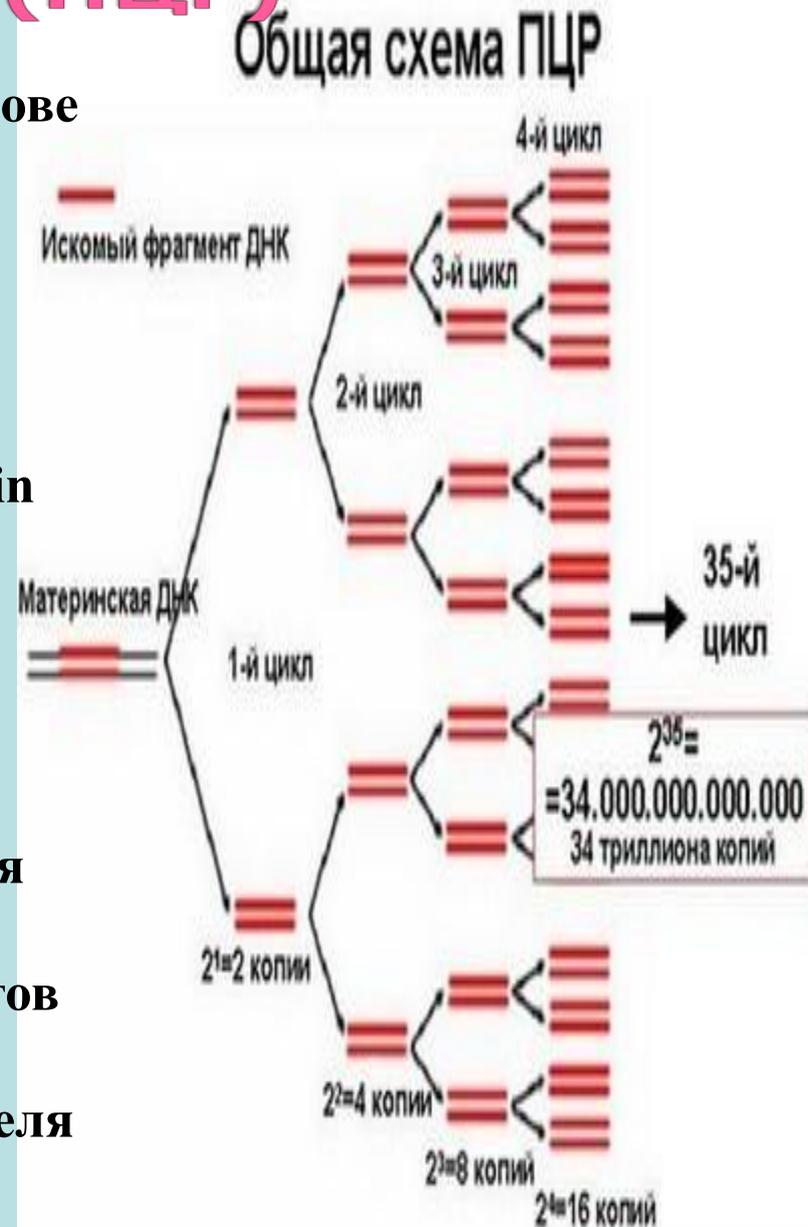
# Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Метод ПЦР был разработан американским биохимиком Кэри Мюллісом в 1983 г. на основе применения открытой им термостабильной ДНК-полимеразы (Таг-полимеразы).

Принцип метода состоит в увеличении в  $10^6$ — $10^8$  раз числа копий специфического участка ДНК возбудителя, катализируемого *in vitro* ДНК-полимеразой в автоматическом режиме.

В искусственных условиях воспроизведение процесса репликации специфического для определенного вида или рода возбудителей участка генома возможно при условии знания его нуклеотидной последовательности.

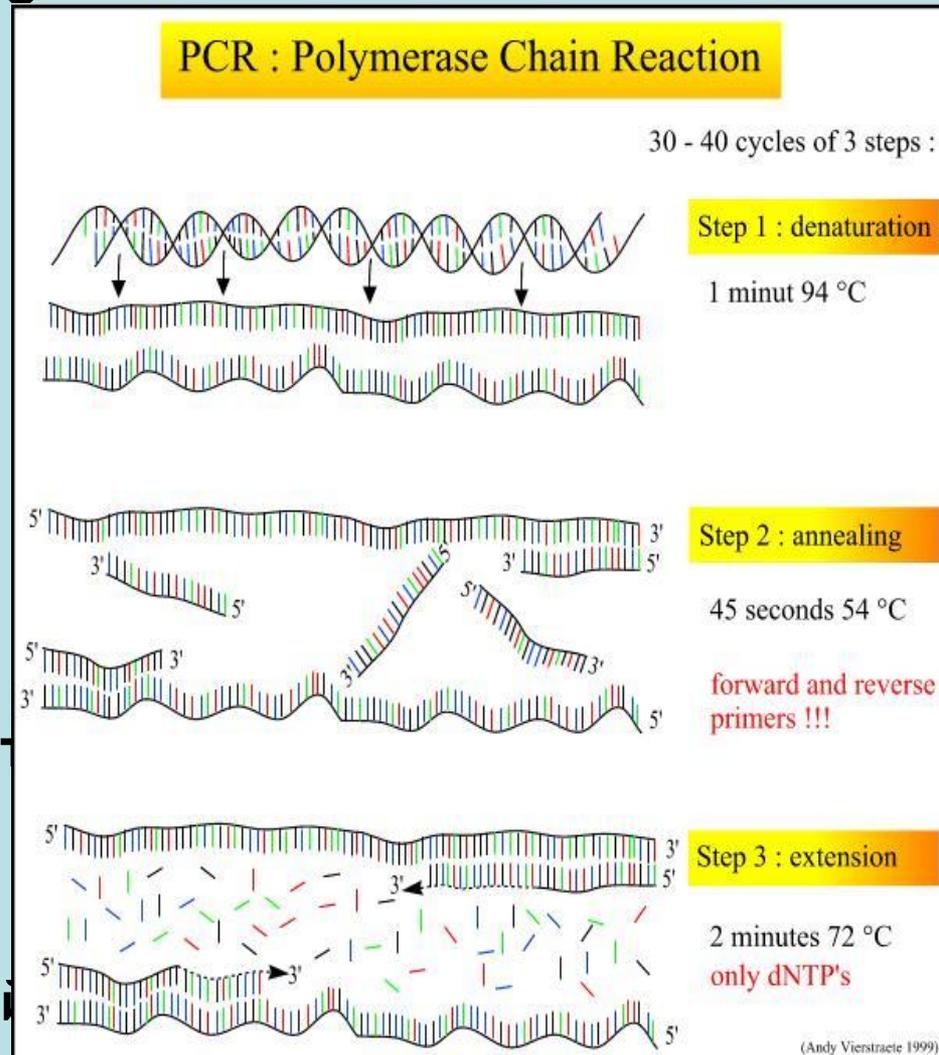
Применение методов распознавания продуктов репликации таких участков (ампликонов) позволяет констатировать наличие возбудителя в исследуемой пробе.



Описанное выше комплементарное достраивание цепей начинается только в определенных стартовых блоках, представляющих собой короткие двунитевые участки. При присоединении таких блоков к специфическим участкам ДНК процесс синтеза новой цепи направляется только в выбранном участке, а не по всей длине цепи ДНК.

Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют две олиго-нуклеотидные затравки, которые называют праймерами.

Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы так, что достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними



**К достоинствам метода ПЦР следует отнести:**

- **высокую чувствительность, позволяющую определять 10—1000 клеток в пробе;**
- **высокую специфичность, поскольку в исследуемом материале выявляется уникальный для данного возбудителя фрагмент ДНК;**
- **универсальность процедуры обнаружения различных возбудителей из одной биопробы;**
- **— высокую скорость анализа (4—4,5 ч);**
- **— возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций.**

**ПЦР эффективна для диагностики труднокультивируемых, форм микроорганизмов. Ее использование целесообразно для выявления возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов.**

**В последнее время достаточно успешно реализуются количественные методы ПЦР-анализа, позволяющие определить концентрацию возбудителя в материале (микробную или вирусную нагрузку), например оценить репликативную активность вируса гепатита В, Си ВИЧ.**

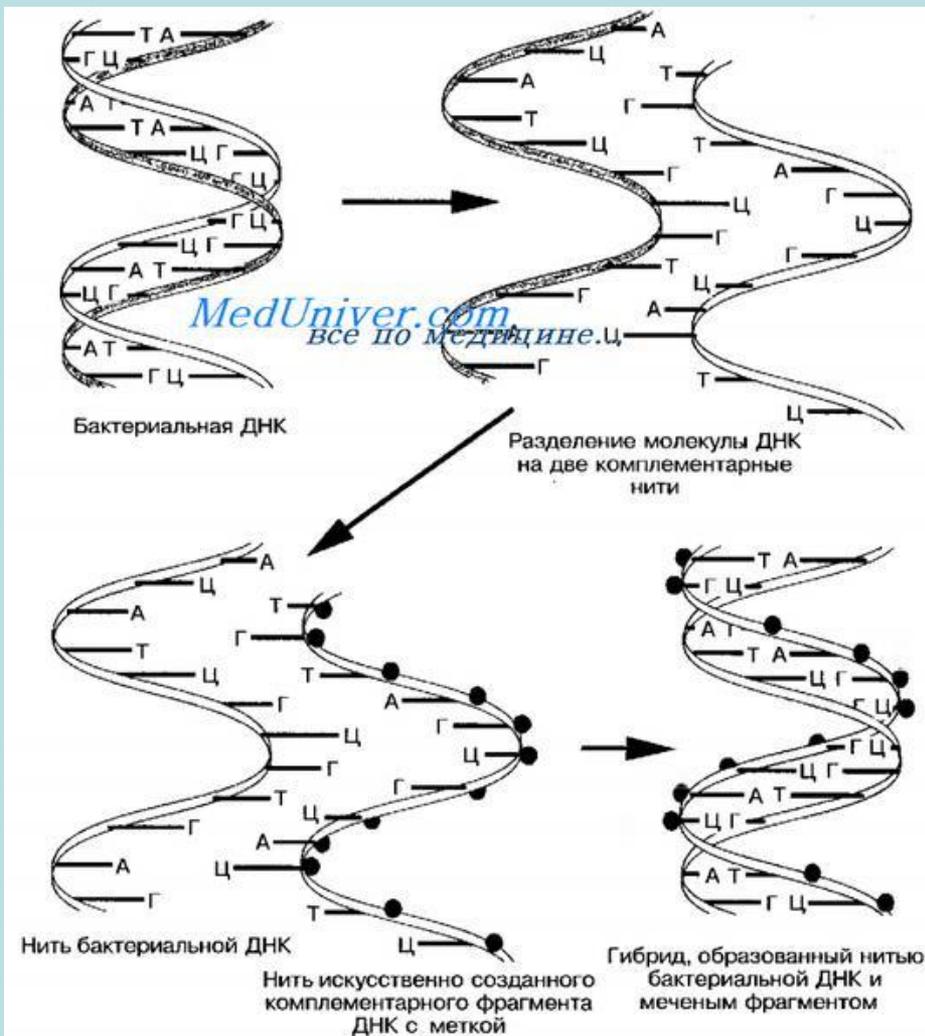
**Однако следует иметь в виду, что метод ПЦР имеет и свои ограничения, в частности, для диагностики инфекций, вызванных условно-патогенной аутофлорой.**

# Гибридизация нуклеиновых

## КИСЛОТ

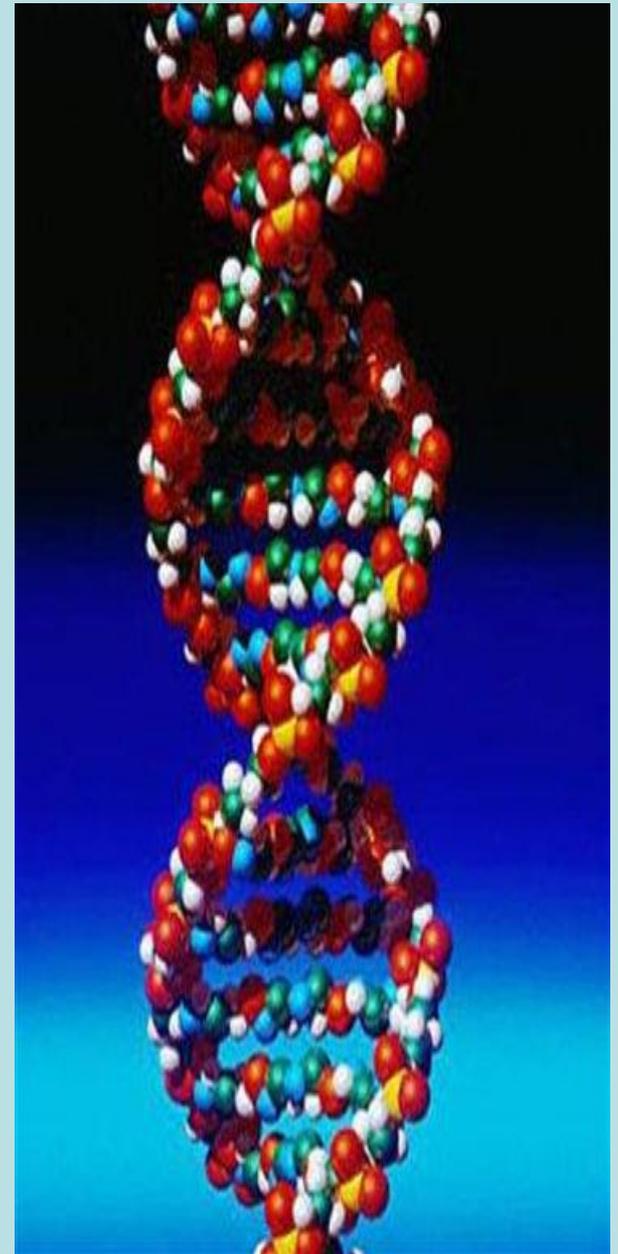
Позволяет идентифицировать возбудителя в пробе без предварительного выделения.

Для проведения анализа синтезируют одноцепочечный ДНК- или РНК-зонд, комплементарный последовательностям возбудителя. Зонд метят радионуклидом, ферментом или другой легко распознаваемой меткой. Исследуемый материал подвергают обработке с целью лизиса микроорганизмов, находящихся в биопrobe, выделения и денатурации ДНК. Далее проводят инкубацию зонда с исследуемым образцом и измерение количества меченой ДНК, вступившей в гибридизацию с ДНК, находящейся в исследуемой



**Реакция может происходить как на твердофазных сорбентах, так и в растворе, однако обязательным условием является отмывка несвязавшихся количеств меченого зонда.**

**Чувствительность метода гибридизации нуклеиновых кислот уступает таковой ПЦР и составляет  $10^3$  микробных клеток в пробе.**



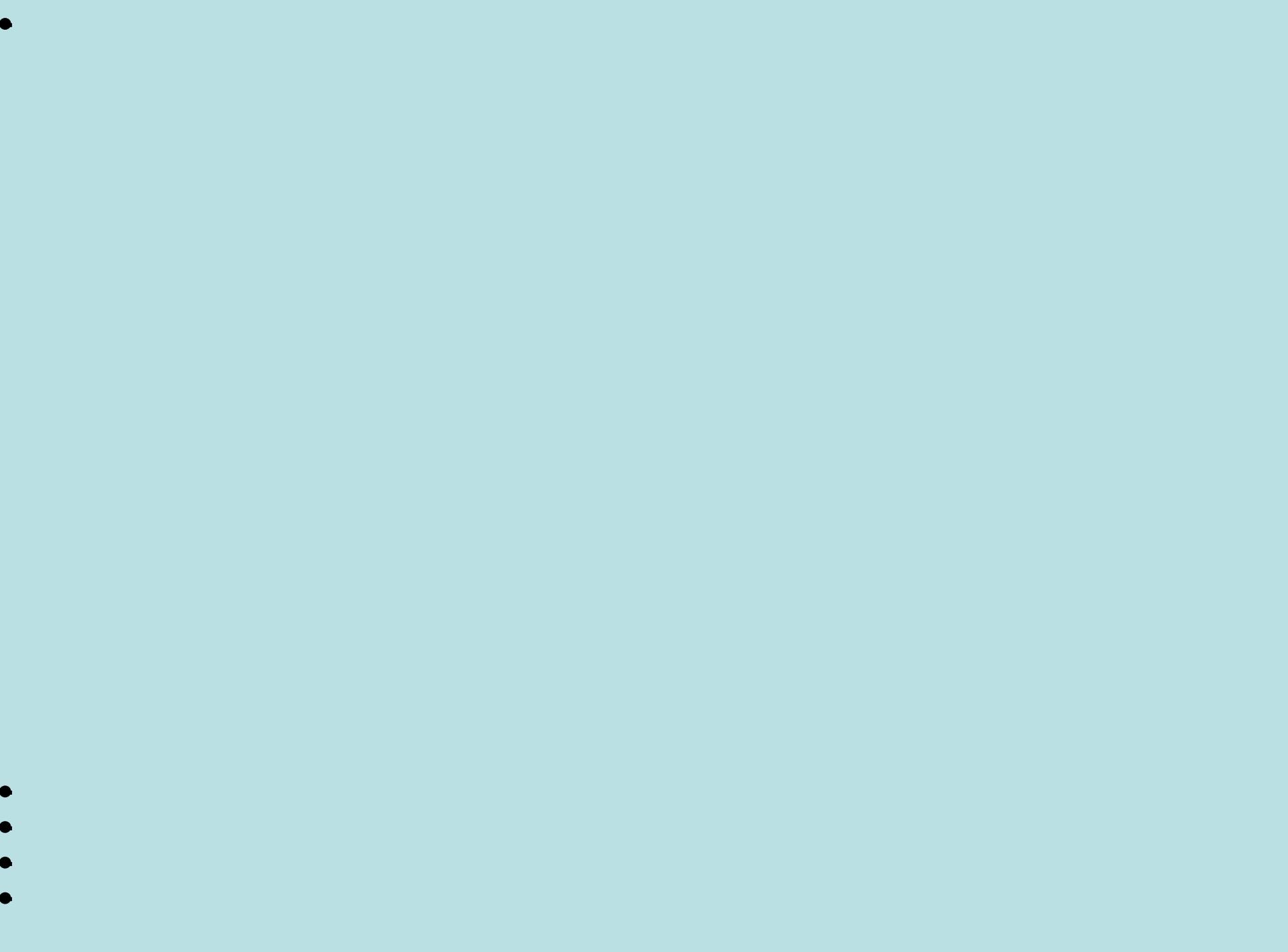


В больницу госпитализирован больной Ю. 15 лет, приехавший из Бурятии. Во время флюорографического исследования в лице выявлено **множественное кистозное поражение легких**. Мальчик **каждое лето проводит в сельской местности**. Прошлым летом упал с лошади, после чего возник приступ **резкой боли в животе с кратковременной потерей сознания**. В течение последующих двух недель периодически появлялась **сыпь на теле**, сопровождавшаяся **зудом кожи**.

При осмотре состояние удовлетворительное. В легких дыхание **везикулярное с жестким оттенком**, много **сухих хрипов**. **Печень увеличена**, выступает на 4 см из подреберья, край ее **умеренно плотный**. Со стороны других органов и систем патологии не выявлено.

1. Какой характер носит поражение легких, механизм его развития?
2. Какие методы наиболее информативны для подтверждения диагноза в данном случае?
3. План лечения больного.











**Менингеальный синдром** у детей старшего возраста и взрослых начинается внезапно: появляются сильная головная боль, озноб и рвота, вскоре развивается ригидность затылочных мышц.

**Ригидность затылочных мышц** — симптом раздражения мозговых оболочек; она бывает как при менингите, так и при других заболеваниях — абсцессах и опухолях головного мозга, субарахноидальных кровоизлияниях, а также при инфекциях дыхательных и мочевых путей.

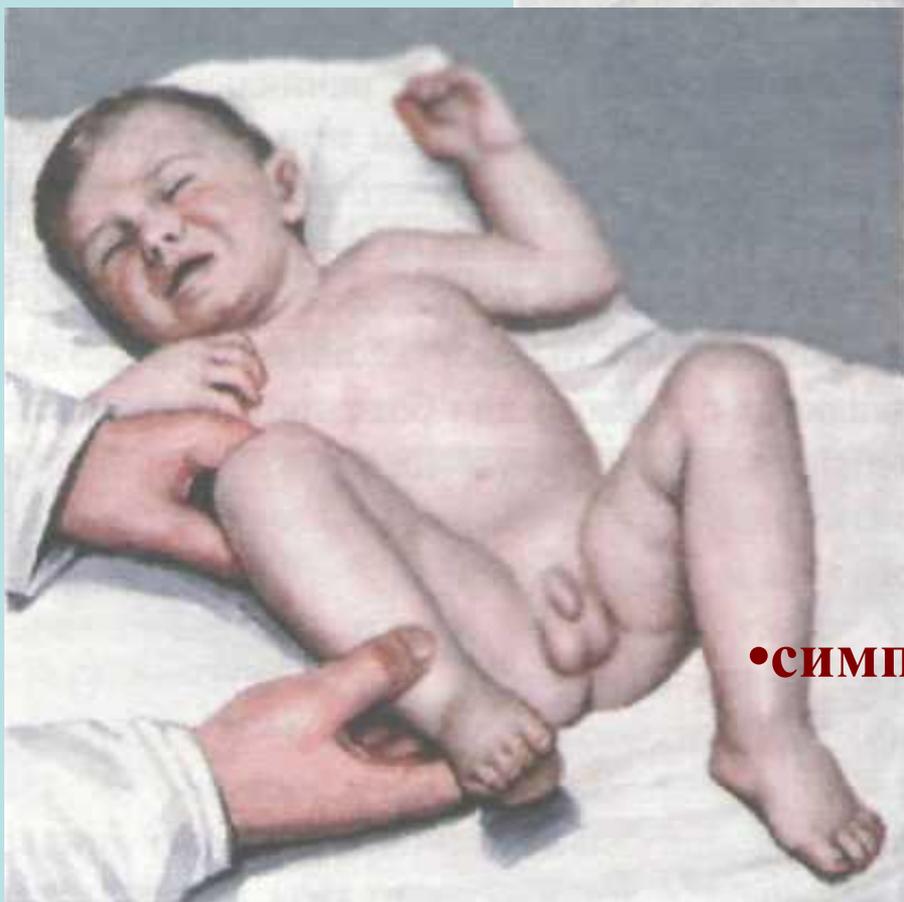
У детей до 2 лет клинические признаки менингита весьма разнообразны, ригидность затылочных мышц бывает редко. Ребенок на снимке лежит лицом к стене: яркий свет его раздражает. Голова слегка запрокинута, это частое явление при менингите. Выраженный опистотонус на фоне лечения развивается редко. В отсутствие лечения раздражительность сменяется сонливостью и комой, иногда развиваются судороги.

Менингит.

ая

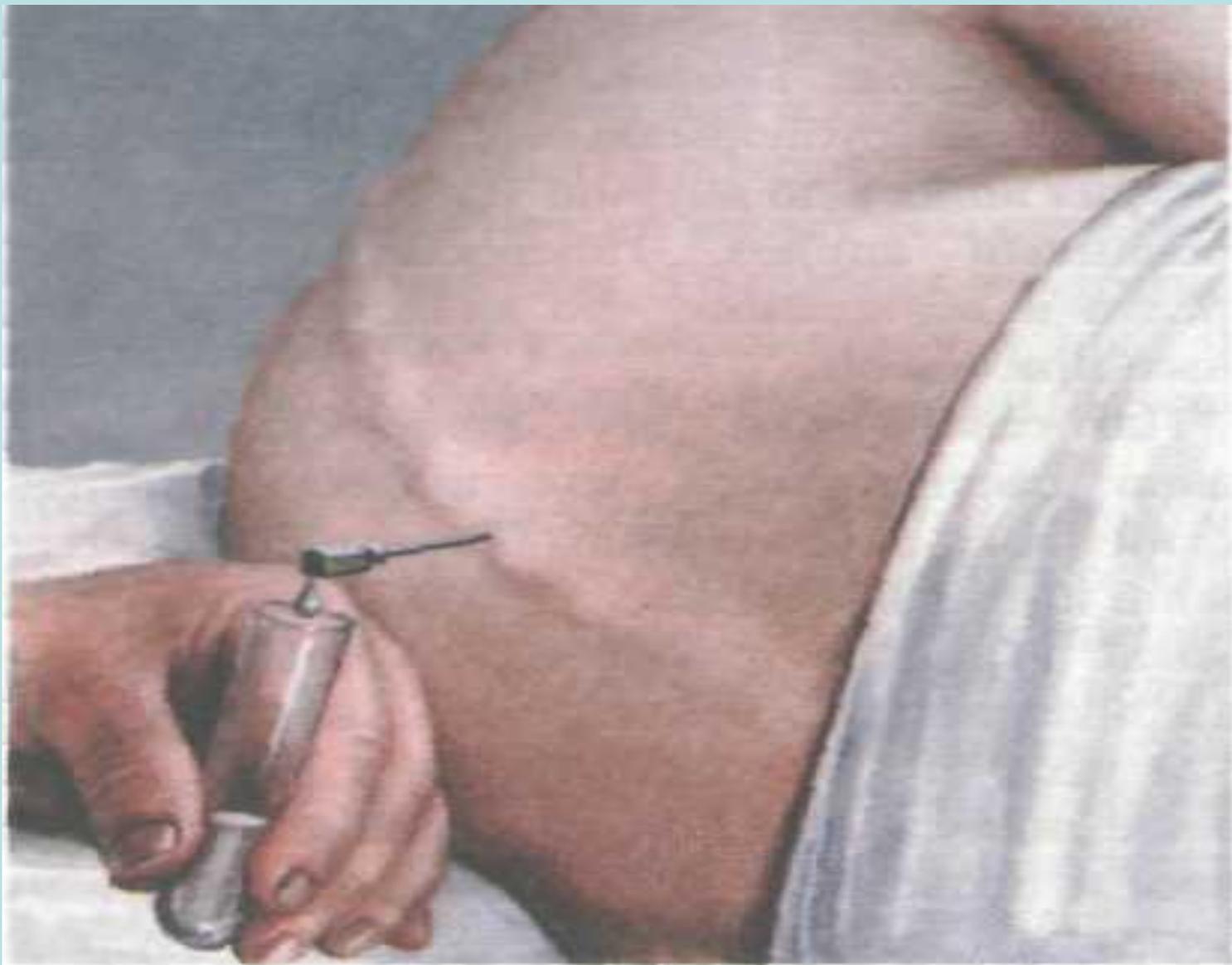


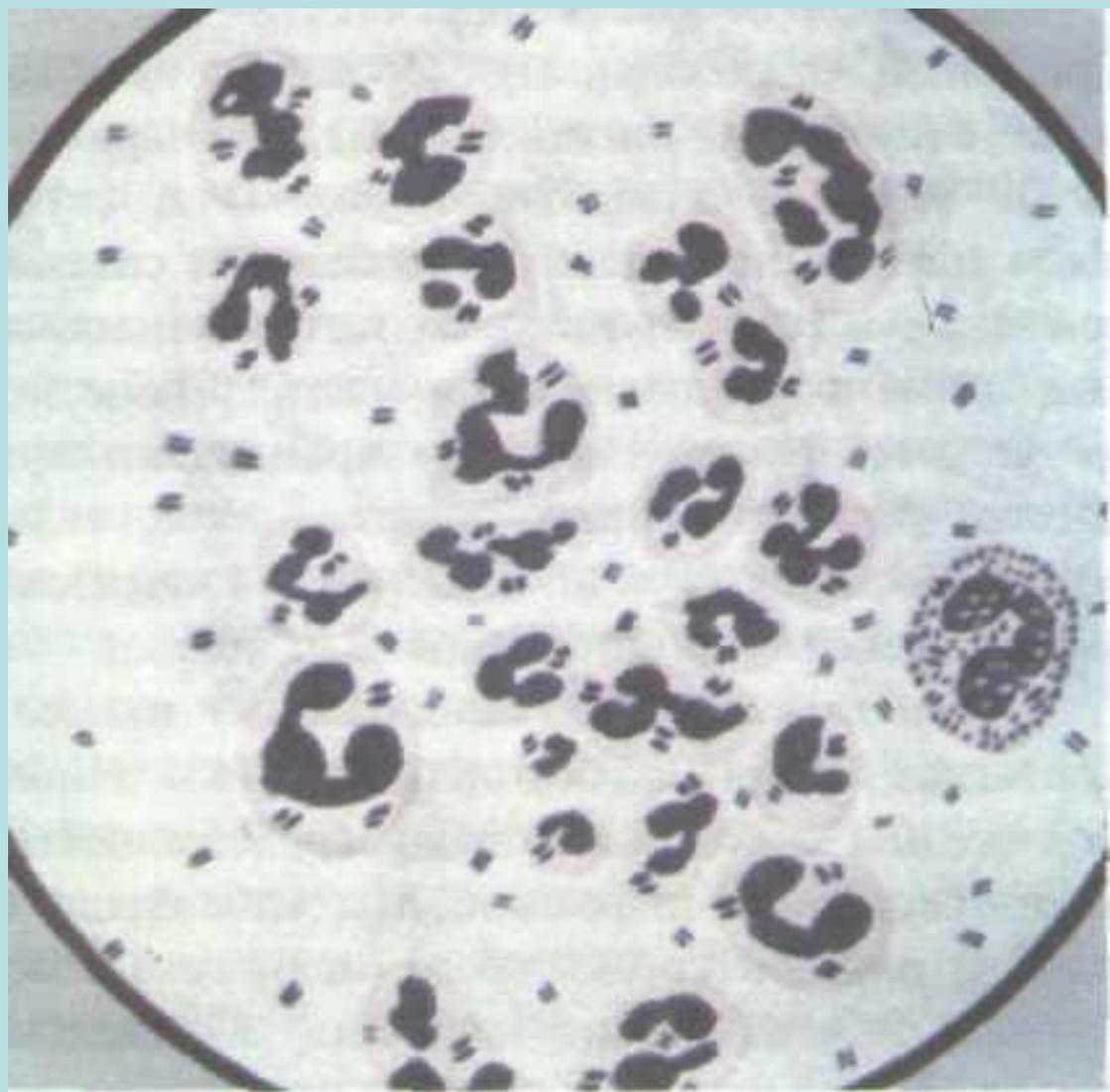
1



•симптом Кернига положительный

↑











1

2

3

4

5



## КЛАССИФИКАЦИЯ СЕПСИСА:

• —

• —

• —

• —

• —

• —

