Національний фармацевтичний університет
Кафедра мікробіології, вірусології та імунології

Лекція з мікробіології з основами імунології
спеціальності 7.12020101 Фармація

МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ БАКТЕРІАЛЬНИХ І ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

Лектор
доцент каф. мікробіології,
вірусології та імунології

План лекції

15.1. Забір матеріалу.
15.2. Матеріал для дослідження.
15.3. Основні методи для мікробіологічної діагностики бактеріальних інфекцій
15.4. Методи культивування бактерій.
15.5. Ідентифікація бактерій.
15.6. Основні методи для мікробіологічної діагностики вірусних інфекцій.
15.7. Експрес-діагностика.
15.8. Культивування вірусів.
15.9. Ідентифікація вірусів.

Питання для самостійного вивчення:

Діагностичні тести

Рекомендована література

1. Мікробіологія: Підр. для студ. / І. Л.Дикий, І. Ю.Холупяк, Н. Ю. Шевельова, та ін. 2-е вид.– Х. : Профессионал, 2006. – 433 с.

2. Микробиология: Руководство к лабораторным занятиям. Учеб. пособие для студентов высших учебных заведений / И.Л. Дикий, И.И Сидорчук, И.Ю. Холупяк, Н.Е. Шевелёва, М.М. Великая, Н.А. Волкова, Л.Ф. Силаева, О.П. Стрилец, О.Г. Гейдерих, В.Е. Литаров. – Х.: Изд-во НфаУ; Золотые страницы, 2002.- 444 с.

3. Микробиология. Методические рекомендации для студентов фармацевтических высших учебных заведений / И.Л. Дикий, И.Ю. Холупяк, М.М. Великая, Н.Е. Шевелева и др. – Х., 2004. – 144 с.

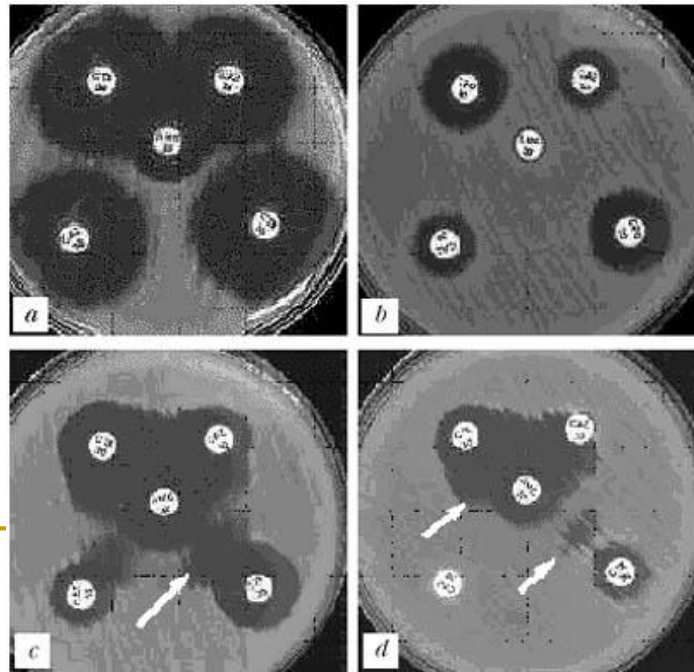
4. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебн. пособ. для студ. мед. вузов / Под. ред. А. А. Воробьева, А. С. Быкова. – М. : Медицинское информационное агентство, 2003. – 236с.

Лабораторна діагностика інфекційних захворювань заснована на виявленні в організмі хворого:

- мікроорганізму, що викликав хворобу,
- мікробних компонентів (антигенів),
- продуктів життєдіяльності (токсинів і інш.),
- змін в показниках гомеостазу під дією цього мікроба (наприклад, формули крові, біохімічного складу крові і ін.)

МЕТА МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

- ідентифікувати мікроорганізми в досліджуваному матеріалі,
- визначити їх видову приналежність,
- морфологічні, біохімічні, токсигенні та антигенні властивості,
- встановити чутливість виділених мікроорганізмів до антимікробних препаратів.



МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

- різні біологічні рідини та інші матеріали, взяті з макроорганізму (кров, гній, сеча, мокрота, ліквор, кал, блювотні маси, промивні води, тощо), і тканина - біопсія від живого або аутопсії від трупа.

- У деяких випадках для дослідження беруть об'єкти навколишнього середовища: повітря, воду, харчові продукти, змиви і т.п.

ПРАВИЛА ЗАБОРУ МАТЕРІАЛУ ДЛЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

- Вид матеріалу визначається клінічною картиною хвороби.
- Кількість матеріалу повинна бути достатньою для проведення дослідження і при необхідності його повторення.
- Матеріал беруть по можливості в початковому періоді хвороби.
- Забір матеріалу повинен здійснюватися до початку антимікробної хіміотерапії.

- Матеріал беруть безпосередньо з осередку інфекції або досліджують відповідне відокремлюване (гній, сечу, жовч та ін.).
- Необхідно виключити можливість контамінації матеріалу нормальної мікрофлорою хворого і мікроорганізмами навколишнього середовища.
- Необхідно попередити попадання в матеріал антимікробних препаратів (дезінфектантів, антисептиків, антибіотиків).
- Транспортування матеріалу в лабораторію слід проводити в максимально короткі терміни.

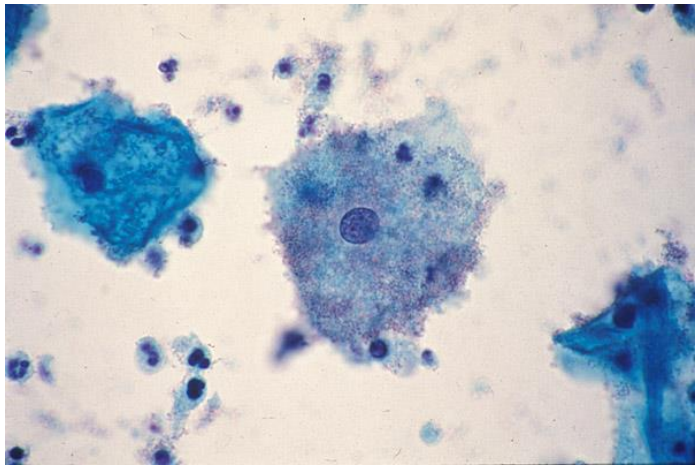
МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ВКЛЮЧАЄ В СЕБЕ 5 МЕТОДІВ

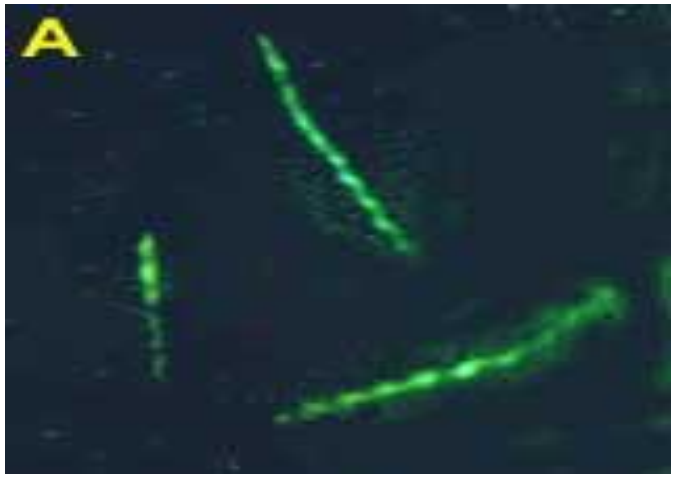
- бактеріоскопічний,
- бактеріологічний (провідний метод),
- серологічний (друге місце за значимістю),
- алергічний,
- біологічний.

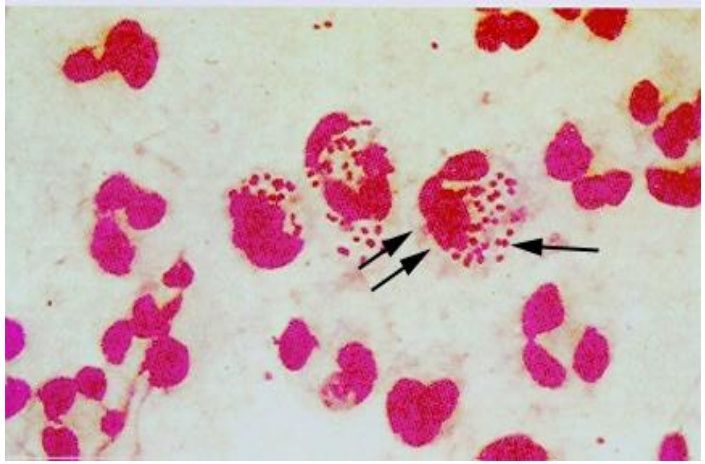
БАКТЕРІОСКОПІЧНИЙ МЕТОД

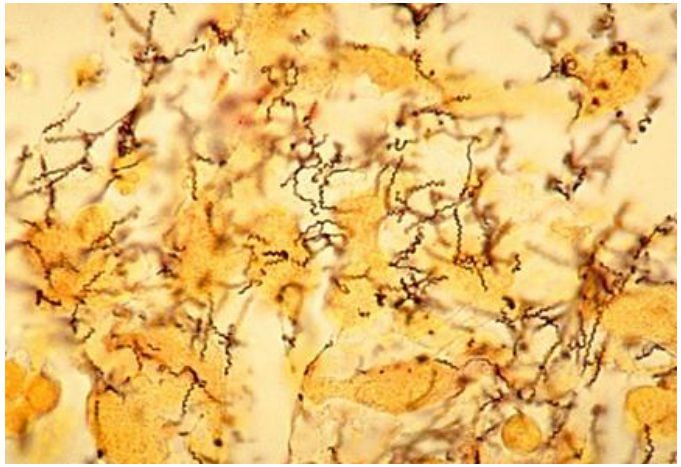
- полягає у приготуванні мікроскопічних препаратів з досліджуваного матеріалу (нативних або забарвлених простими або складними способами)
- та їх мікроскопії з застосуванням різних видів мікроскопії (світлова, темнопольна, фазово-контрастна, люмінісцентна, електронна).

МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ

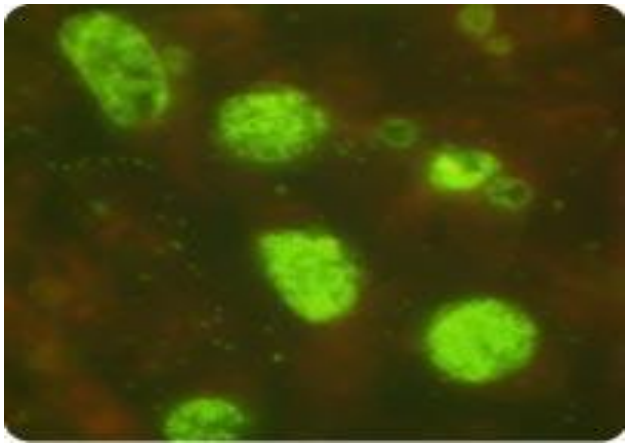


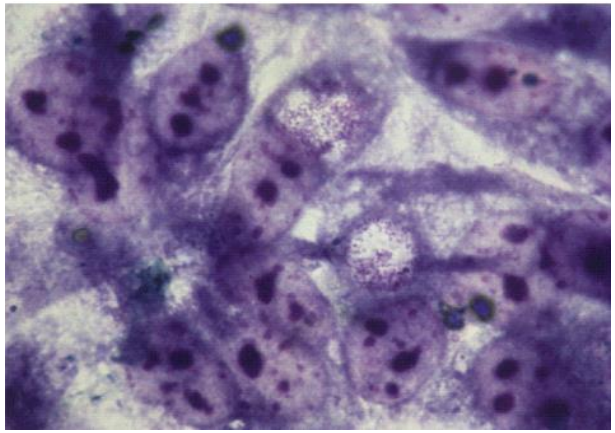






ВИДИ МІКРОСКОПІЇ





БАКТЕРІОЛОГІЧНИЙ МЕТОД

- полягає в посіві досліджуваного матеріалу на штучні живильні середовища з метою виділення та ідентифікації чистої культури збудника.

ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЧИСТИХ КУЛЬТУР БАКТЕРІЙ

1-й день.

- Мікроскопія досліджуваного матеріалу.
- Посів досліджуваного матеріалу на живильні середовища (щільне, рідке).

2-й день.

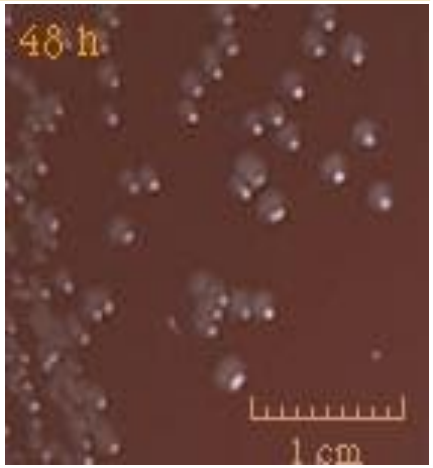
- Вивчення культуральних властивостей.

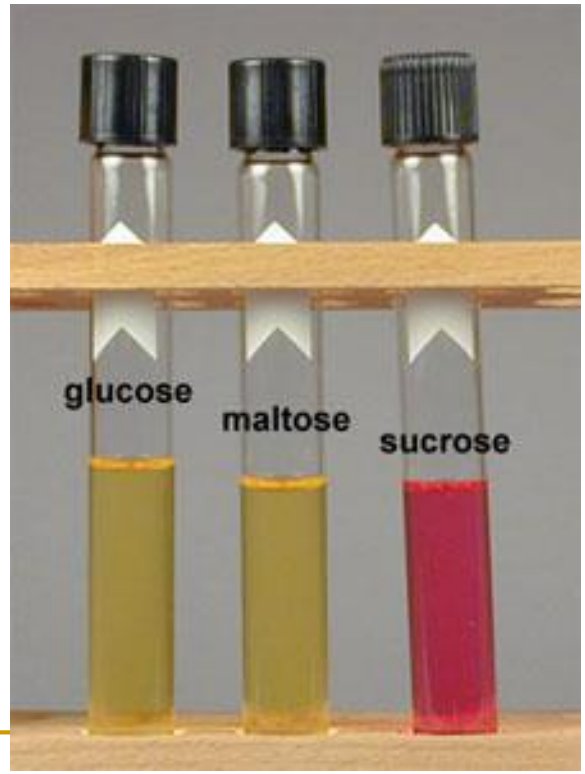
- Пересів колоній на щільні живильні середовища для накопичення чистої культури.

3-й день

Ідентифікація виділеної культури:

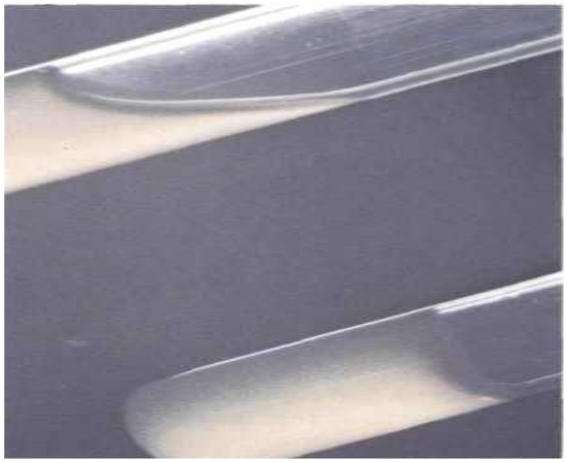
- Перевірка чистоти виділеної культури.
- Вивчення біохімічних властивостей: сахаролітичних, протеолітичних.
- Вивчення фагочутливості, коліциночутливості, чутливості до антибіотиків та інших властивостей.





- Тест на каталазу

Коагулазний тест

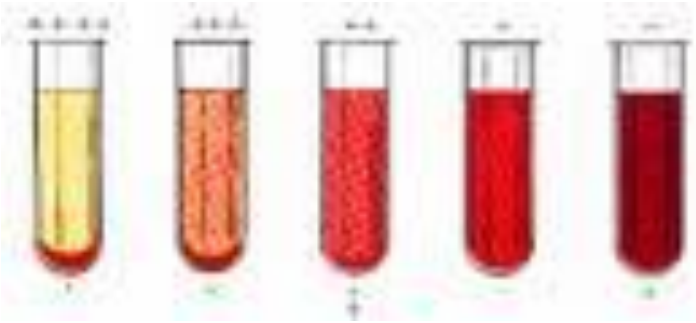


Фаготипування

Гемолітичні властивості

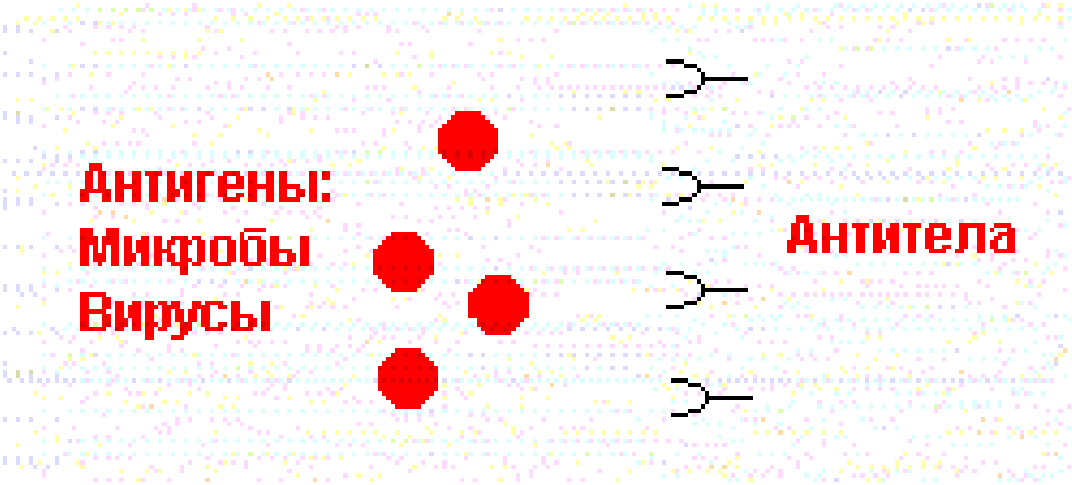
СЕРОЛОГІЧНИЙ МЕТОД

- полягає у визначенні титру специфічних антитіл у сироватці крові хворого,
- рідше у виявленні мікробного антигену в досліджуваному матеріалі.
- З цією метою використовують реакції імунітету.



ОСНОВНІ СЕРОЛОГІЧНІ РЕАКЦІЇ

- Аглютинації
- Преципітації
- Лізису
- Нейтралізації
- Їх різні модифікації



МЕТОДИ ЕКСПРЕС ДІАГНОСТИКИ

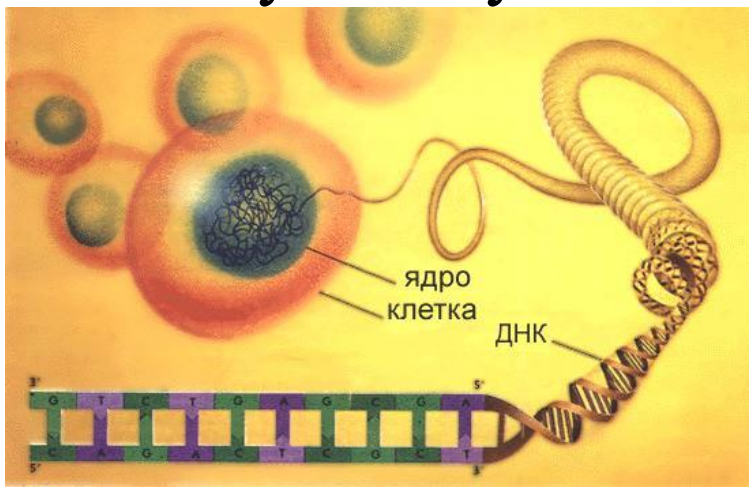
- Дозволяють поставити мікробіологічний діагноз протягом короткого проміжку часу (від декількох хвилин до декількох годин) з моменту доставки досліджуваного матеріалу в лабораторію.

- До цих методів належать РІФ, ІФА, РІА (радіоімунний аналіз), ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція), газова хроматографія та інш.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ МЕТОД

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

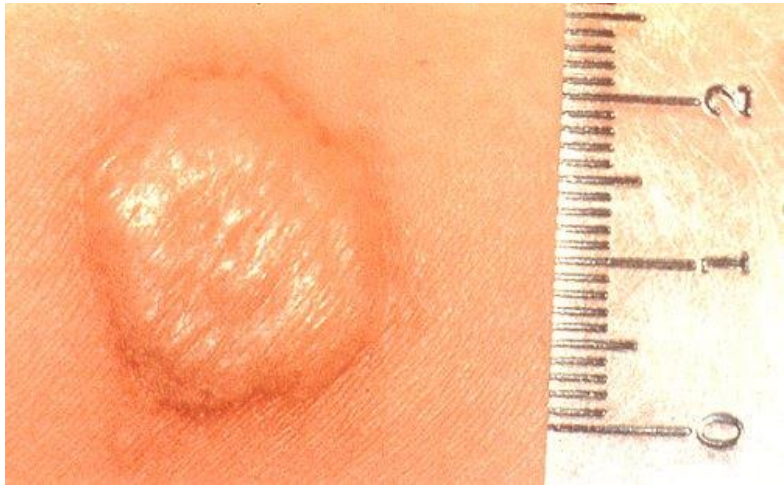
Метод заснований на виявленні в досліджуваному матеріалі ДНК збудника



Переваги методу:

Висока чутливість.
Висока специфічність.
Швидкість отримання результату.
ПЛР дозволяє здійснювати діагностику не лише гострих, але й латентних інфекцій.

АЛЕРГОЛОГІЧНИЙ МЕТОД



- полягає у виявленні інфекційної алергії (ГУТ) на діагностичний мікробний препарат-алерген.

- З цією метою ставлять шкірні алергічні проби з відповідними алергенами (туберкулін, антраксін, пестін, бруцеллін, малеін, тулярін).

АЛЕРГІЧНІ ПРОБИ

- 1 група (in vivo): шкірні проби, здійснювані безпосередньо на хворому і виявляючі алергію негайного (через 20 хв) та уповільненого (через 24-48 год) типів.

- 2 група (in vitro): алергічні проби, засновані на вивченні процесів сенсибілізації не в організмі хворого, а в пробірці.

БІОЛОГІЧНИЙ МЕТОД

- Полягає у зараженні досліджуваним матеріалом чутливих лабораторних тварин.

- Його використовують для:

✓ виділення чистої культури збудника,

✓ визначення типу токсину,

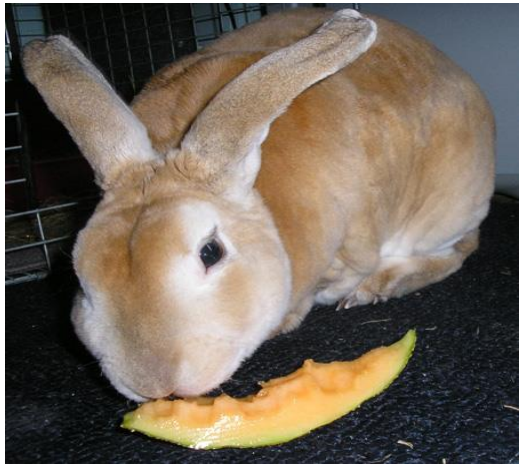
✓ активності антимікробних хіміотерапевтичних препаратів і т.д.

ВИБІР ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

визначається метою роботи.

Найбільш часто використовують для зараження:

- кролів,
- морських свинок,
- білих мишей
- білих щурів.



МЕТОДИ ЗАРАЖЕННЯ

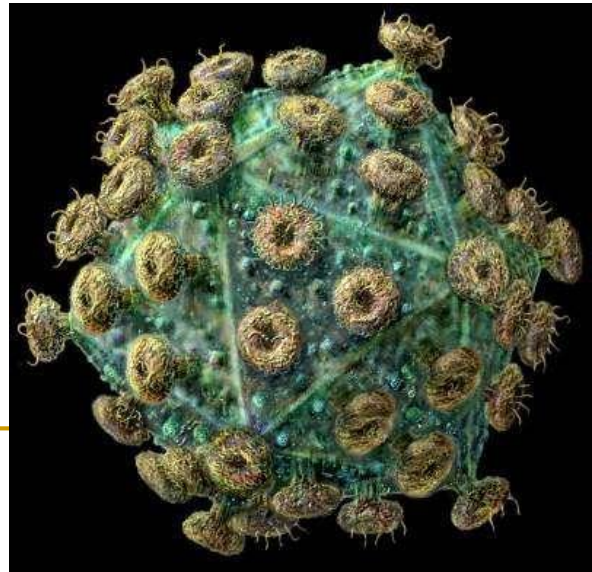
Інфекційний матеріал вводять:

- всередину,
- в дихальні шляхи,
- внутрішньочеревно,
- внутрішньовенно,
- внутрішньом'язово,
- внутрішньошкірно,
- підшкірно,
- в передню камеру ока,
- через трепанаційний отвір черепа,
- субокципітально (у велику цистерну головного мозку).

МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ПРИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЯХ ВКЛЮЧАЮТЬ

- виділення та ідентифікацію збудника;
- виявлення і визначення титрів противірусних АТ;
- виявлення АГ вірусів у зразках досліджуваного матеріалу;
- мікроскопічне дослідження

препаратів досліджуваного матеріалу.



ЗАБІР МАТЕРІАЛУ

необхідно виконувати наступні умови:

- зразки слід відбирати якомога раніше або з урахуванням ритму циркуляції збудника;
- матеріал слід відбирати в обсязі, достатньому для всього комплексу досліджень;
- зразки слід доставляти в лабораторію негайно (!), при відносно короткочасному транспортуванні (не більше 5 діб) зразки зберігають на льоду, при більш тривалому - при температурі - 50 ˚С.

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

- вміст везикул, пустул,
- зіскрібки епітелію,
- спинномозкова рідина,
- фекалії,
- мазки та змиви з верхніх дихальних шляхів.

3 ОСНОВНИХ МЕТОДИ ДЛЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

- ***Вірусологічний*** - виділення з досліджуваного матеріалу вірусу і його подальша ідентифікація.
- ***Серологічний*** - визначення специфічних імунологічних змін в організмі під дією вірусів (найчастіше за допомогою діагностикумів виявляють в сироватці крові противірусні антитіла).
- ***Молекулярно-біологічна діагностика*** - виявлення в клінічному матеріалі фрагментів НК вірусів-збудників за допомогою зондів (гібридизація НК) або ПЛР.

ВІРУСОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

- Виділення та ідентифікація збудника - «золотий стандарт» у діагностиці вірусних інфекцій.
- Першим етапом є отримання та підготовка однієї з живих систем:
- ✓ культур клітин: первинні, напівперещеплювані (диплоїдні) і перещеплювані клітинні культури;
- ✓ курячих ембріонів; Термін виконання - 24 години.
- ✓ чутливих лабораторних тварин.

- Найбільш трудомісткою є робота з клітинними культурами.

ДЛЯ ЕКСПРЕС-ДІАГНОСТИКИ

- Важливо взяти матеріал у хворого якомога раніше.
- Проби для дослідження треба брати, дотримуючись правил асептики, щоб запобігти внесенню сторонньої мікрофлори і не інфікувати себе.
- Зберігають проби у вологому стані на холоді і пересилають в контейнерах з сухим льодом.
- Якщо проби не використані відразу, їх слід заморозити.
- Зіскрібки з уражених ділянок шкіри, занурюють у стабілізуюче середовище (нейтральний ізотонічний розчин хлориду натрію з білком і антибіотиками). Можна використовувати також поживні середовища або розчин Хенкса з додаванням 10% інактивованої коров'ячої сироватки та антибіотиків (для пригнічення супутньої мікрофлори).

КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСІВ

проводиться шляхом інфікування вірусовмісним матеріалом живих систем:

- ✓ культури клітин,
- ✓ курячих ембріонів,
- ✓ експериментальних тварин.

КУЛЬТУРА ТКАНИН

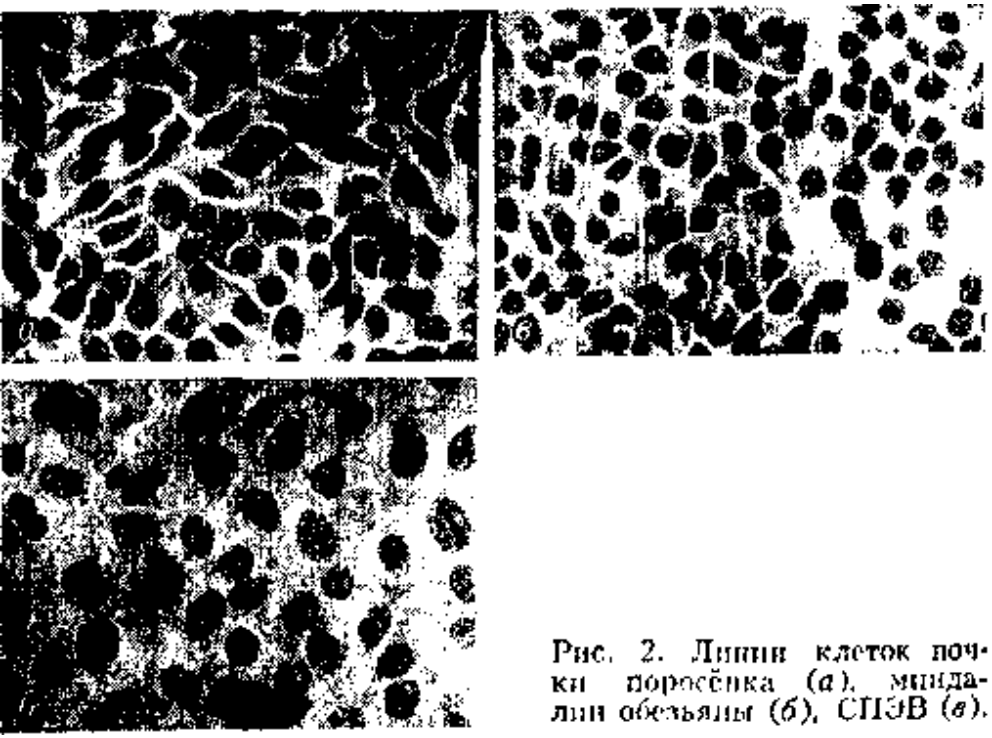
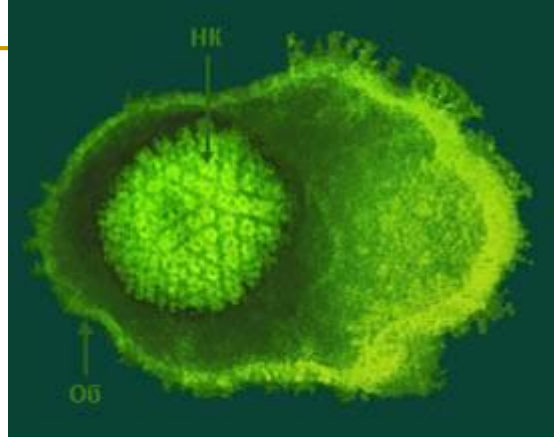


Рис. 2. Линии клеток почки поросёнка (*а*), миндалин обезьяны (*б*), СПЭВ (*в*).

- метод вирощування поза організмом в штучно створених умовах клітин, тканин або органів.
- У культурах тканин і органів (головним чином органи ембріонів) підтримують їх життєздатність або ріст при збереженні диференціації тканини, структури і функції органу.
- Культура клітин росте поза організмом без утворення тканин.

ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСІВ
ДЧИТЬ



в культурі клітин:

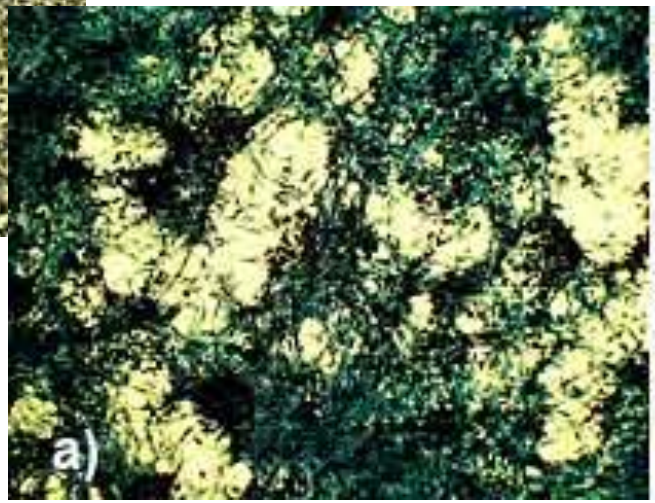
- виявлення цитопатичної дії;
- реакція гемадсорбції (до розвитку ЦПД);
- кольорова проба;
- внутрішньоклітинні включення;
- електронно-мікроскопічне виявлення;
- пряма РІФ;
- утворення бляшок.

в курячих ембріонах:

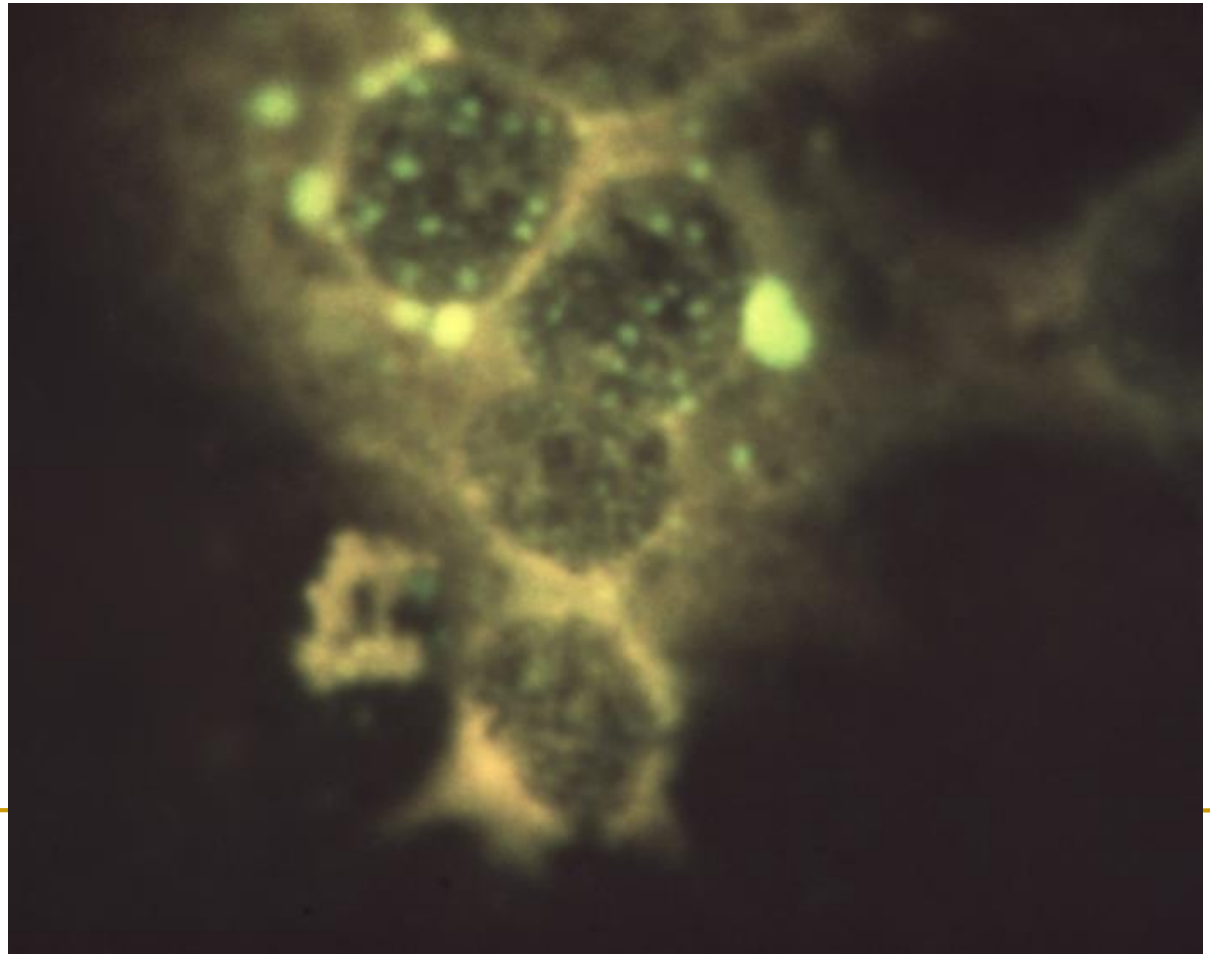
- зміна хоріоналантоїсної оболонки;
- реакція гемаглютинації.

Перещеплювана культура клітин нирки кішки - CrFK

Цитопатична дія вірусу на культуру клітин CrFK



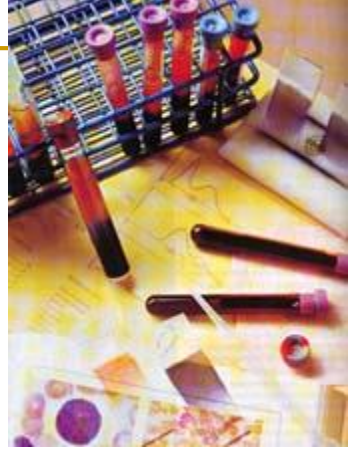
Люмінесцентна мікрофотографія культури клітин амніону людини, заражених вірусом кору: зони локалізації вірусного антигену мають зеленувате світіння (метод флуоресцентний антитіл).



ІДЕНТИФІКАЦІЮ ВІРУСІВ ПРОВОДЯТЬ ЗА ТАКИМИ ОЗНАКАМИ:

- Вірусіндуковані патологічні зміни у чутливих живих системах;
- Антигенні властивості вірусів в серологічних реакціях з противірусними видовими і типовими сироватками (є основною і достатньо точною ідентифікацією);
- Виявлення вірусної НК, наприклад, методом ЦПР;
- Результати електронно-мікроскопічного вивчення морфології вірусів.

СЕРОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ



засновано на виявленні в крові хворого противірусних антитіл в серологічних реакціях з використанням специфічних вірусних антигенів - діагностикумів або специфічних тест-систем.

Термін виконання - від 24 до 48 годин.

В основі більшості серологічних реакцій при вірусних інфекціях лежить реакція взаємодії вірусних антигенів і гомологічних антитіл.

<u>в рідкому середовищі:</u>

РЗК - реакція зв'язування комплементу

РГГА - реакція гальмування гемаглютинації

РНГА - реакція непрямої гемаглютинації

РЗНГ - реакція зворотної непрямої гемаглютинації

РГЗНГА - реакція гальмування зворотної непрямої гемаглютинації

РІА - радіоімунний аналіз

в гелі:

РПГ - реакція преципітації в гелі,
РРГ - реакція радіального гемолізу,
РЗІЕФ - реакція зустрічного імуноелектрофореза.

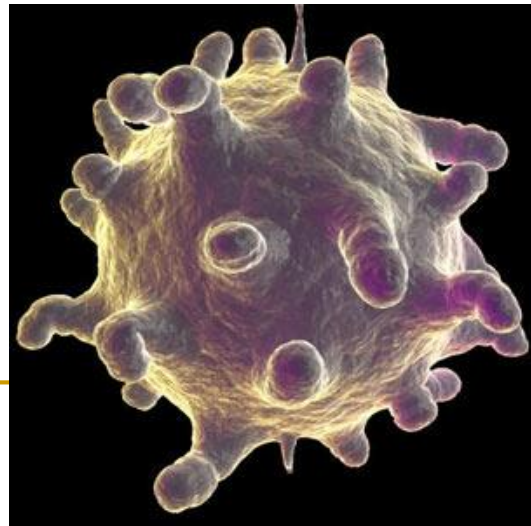
при фіксації одного з інгредієнтів на твердій основі:

ІФА - імуноферментний аналіз
ІЕМ - імунна електронна мікроскопія,
РГадсТО - реакція гемадсорбції на твердій основі,
РІФ - реакція імунофлюоресценції,
РГадс - реакція гемадсорбції,
РГГадс - реакція гальмування гемадсорбції

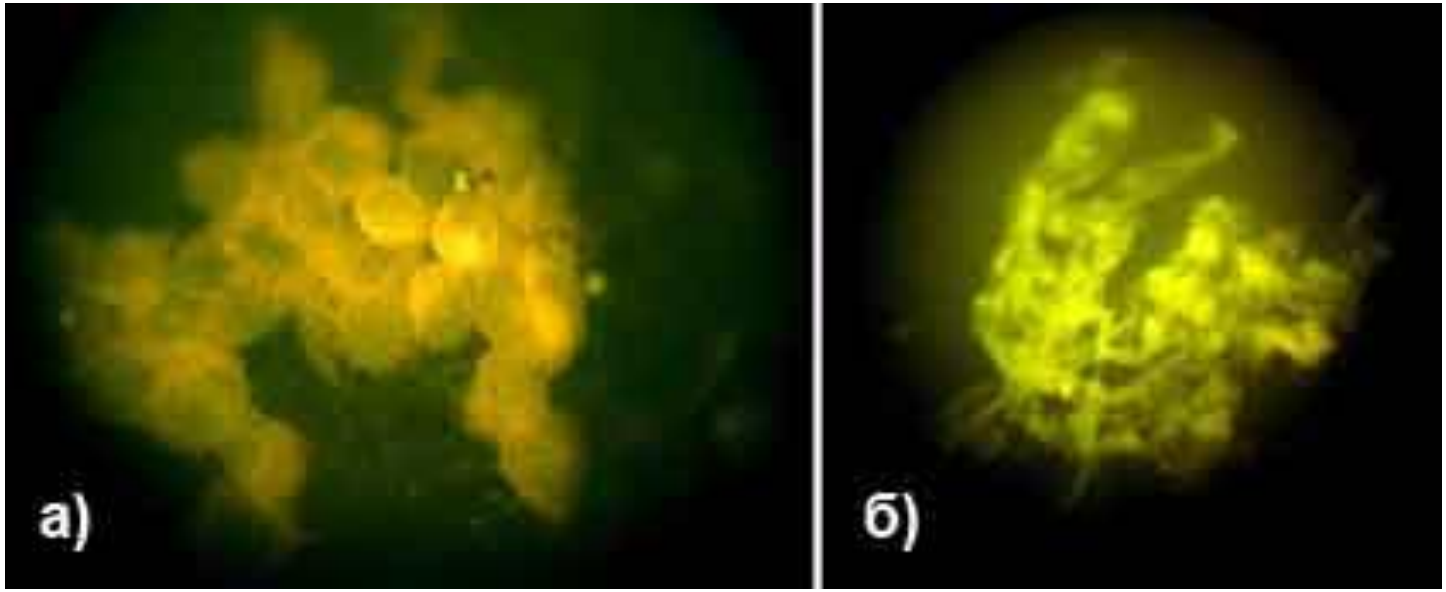
ДЛЯ ЕКСПРЕС-ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ВИКОРИСТОВУЮТЬ:

- РІФ - реакція імунофлюоресценції,
- ІЕМ - імунна електронна мікроскопія,
- РЗІЕФ - реакція зустрічного імуноелектрофореза,
- РГадсТО - реакція гемадсорбції на твердій основі,
- ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція.

.



РІФ



ЕКСПРЕС-ДІАГНОСТИКА

- Термін виконання - 40 хвилин.

ПЛР-ДІАГНОСТИКА

Термін виконання

ВИБІР МЕТОДІВ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ОКРЕМИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ВИЗНАЧАЄТЬСЯ:

- характером захворювання,
- клінічними особливостями перебігу,
- біологічними властивостями збудника,
- періодом хвороби,
- можливостями лабораторії.

ВИСНОВКИ

Лабораторна діагностика інфекційних захворювань заснована на виявленні в організмі хворого:

- мікроорганізму, що викликав хворобу,
- мікробних компонентів (антигенів),
- продуктів життєдіяльності (токсинів і інш.),
- змін в показниках гомеостазу під дією цього мікроба (наприклад, формули крові, біохімічного складу крові і ін.)

Дякую за увагу!