10. Solomon A. Amniotic membrane transplantation for reconstruction of conunctively fornices /A.Solomon, E.M.Espana, S.C.G.Tseng // Ophthalmology.- 2003.- Vol.110, №1.- P.93-100.

*Палий В.Г., Присяжная С.В., Тарамбула А.Ю., Дудар А.А.*

**ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЯЗВЫ РОГОВИЦЫ**

**Резюме.** *Провели 2 серии экспериментов. В первом изучали реакцию глаза на биоимплант в роговичном кармане. Свежая и консервированная в декаметоксином® (ДКМ®) амниотическая оболочка (АО) рассосались без признаков воспаления за трое суток. В другом исследовании изучали течение бактериальной язвы роговицы (БВР) при лечении различными способами. Быстрее заживления БВР состоялось при комбинированном лечении с использованием консервированной в ДКМ® АО: эпителизация язвы роговицы завершилась на 8,7±0,5 сутки, интенсивность помутнения составило 0,6 балла, площадь неоваскуляризации роговицы составила 12,6±0,2 мм². В контрольной группе (медикаментозное лечение) эпителизация завершилась на 16,5±0,6 сутки (р = 0,03), интенсивность помутнения составила 3,3 балла, площадь неоваскуляризации роговицы была 30,83±0,85 мм² (р = 0, 03).*

**Ключевые слова:** *бактериальная язва роговицы, амниотическая оболочка, Декаметоксин.*

*Paliy V., Prysyazhna S., Tarambula O., Dudar A.O.*

**SUBSTANTIATION OF THE EFFECTIVENESS OF THE COMBINED TREATMENT OF BACTERIAL CORNEAL ULCER**

*Summary. Spent two series of experiments. The first examined the reaction of the eye to Bioimplant a corneal pocket. Fresh and preserved in decamethoxinum (DCM) amniotic membrane (AM) resolved no signs of inflammation in three days. The second study examined the course of bacterial corneal ulcers (BCU) in the treatment of different ways. BCU fastest healing took place in the combined treatment using canned in DCM AM: epithelization corneal ulcer ended at 8,7±0,5 day, clouding intensity was 0.6 points, corneal neovascularization area was 12,6±0,2 mm². In the control group (medication) epithelization ended na16,5±0,6 days (p=0.03), the intensity of turbidity was 3.3 points, corneal neovascularization area was 30,83±0,85 mm² (p=0,03).*

**Key words:** *bacterial corneal ulcer, amniotic membrane, Decamethoxin.*

***Рецензент - д.мед.н., професор Палій Г.К.***

*Стаття надійшла до редакції: 19.10.2015 р.*

*Палій Віктор Гордійович* - д.мед.н., професор кафедри загальної хірургії ВНМУ ім. М.І.Пирогова; +38 0432 57-03-79
Присяжна Світлана Василівна - к.мед.н, асистент кафедри терапії факультету післядипломної освіти ВНМУ ім.М.І.Пирогова; +38 067 60-32-999; prysvet@ukr.net
*Тарамбула Олександр Юрієвич* - лікар-інтерн ВНМУ ім.М.І.Пирогова; +38 0432 57-03-79
*Дудар Аліна Олександрівна* - здобувач кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету імені М.І.Пирогова; +38 067 17-45-442

© Широбоков В.П., Войцеховський В.Г., Якименко А.І.

**УДК:** 616-022.083.37-076:57

***Широбоков В.П., Войцеховський В.Г., Якименко А.І.***
Національний медичний університет імені О.О.Богомольця (б-р Шевченка, 13, м.Київ, 01601, Україна)

# МІКРОБІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНОЇ ПАТОЛОГІЇ ТА ЇХ ЗНАЧЕННЯ ПРИ ВИКЛАДАННІ МЕДИЧНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ

**Резюме.** *Мікробіологічна діагностика є основою етіологічного діагнозу інфекційних захворювань. Вона ґрунтується на виявленні збудника, його генетичного матеріалу, метаболітів та реакцій організму людини на нього. Розглянуто різні методи діагностики. Проаналізовані їх позитивні й негативні сторони. Розвиток мікробіологічної науки виступає потужним стимулом появи нових мікробіологічних методів дослідження.*

**Ключові слова:** *мікробіологічна діагностика, імунологічні методи, ланцюгова полімеразна реакція.*

## Вступ

Лабораторна діагностика інфекційних захворювань є основою етіологічного діагнозу без якого неможливе існування доказової медицини. Етіологічний діагноз гострих інфекційних захворювань та інших форм інфекційного процесу (опортуністичних інфекцій, мікст-інфекцій, токсикоінфекцій та інших) ґрунтується на виявленні збудника, його генетичного матеріалу, метаболітів та реакцій організму на нього.

Вивчаючи дисципліну "Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія", студенти знайомляться з розмаїттям патогенних представників світу мікроорганізмів, їх біологічними властивостями. При цьому вирішується практичне завдання: постановка етіологічного діагнозу, призначення адекватного антимікробного лікування та, по-можливості, визначення джерела інфекції [6].

*Мета* роботи - розглянути та обґрунтувати доцільність використання традиційних та сучасних методів мікробіологічної діагностики інфекційних захворювань при викладанні медичної мікробіології.

## Результати. Обговорення

В залежності від попереднього діагнозу, клініки та можливої природи інфекційного захворювання, матеріалом для дослідження може бути: кров, сеча, фе-

кальні маси, змиви з носоглотки і зіву, спинномозкова рідина, вміст везикул, пустул, ран, виділення з вушних раковин, кон'юнктиви очей, секційний матеріал. Можливе дослідження ґрунту, води, повітря, харчових продуктів, ліків.

Дослідження здійснюють в мікробіологічних лабораторіях, категорія яких залежить від рівня патогенності збудників інфекційних захворювань.

Мікроскопія матеріалу - це метод визначення збудника захворювання та його структурних елементів у нативному або фіксованому та зафарбованому стані. Метод відносно простий, ранній, швидкий і доступний. Використовують різні методи мікроскопії, фарбування препаратів. Можливе використання вітальних барвників і дослідження матеріала в роздавленій чи висячій краплі. До недоліку методу відносять неможливість лише за морфологією розпізнати збудника і визначити його видову належність. Тому метод має допоміжне і орієнтоване значення. Існує обмежений перелік інфекцій, де метод може бути достатнім для постановки діагнозу (гостра гонорея, епідемічний поворотний тиф, малярія, деякі мікози та інші). Виявленню збудників допомагає використання спеціальних методів фарбування (за Цілем-Нільсоном - мікобактерій туберкульозу, лепри). В окремих випадках слід враховувати локалізацію і клінічні прояви інфекції. У виділеннях з твердого шанкру слід шукати збудника сифілісу, в гнійних виділеннях з уретри при гострому уретриті слід шукати, в першу чергу, гонококи. На цю особливість звертають увагу і при діагностиці сибірки, чуми, анаеробної інфекції ран. Метод дає позитивний результат лише при досягненні в матеріалі кількості бактерій 105-106/мл. В окремих випадках, наприклад, при хламідійній інфекції, виявляють внутрішньоклітинні включення.

Для збудників неклітинної природи (віруси, пріони) застосовують електронну, атомно-силову мікроскопію (роздільна здатність - долі нанометра) та рентген-структурний аналіз. Це вимагає використання прийомів контрастування препаратів солями важких металів (урану, вольфраму, осмію, золота). Електронну мікроскопію використовують у великих, добре обладнаних, потужних лабораторіях, переважно наукового характеру. Лише при деяких вірусних інфекціях вона набуває діагностичного значення (гепатит А, ротавірусна інфекція).

До сучасних методів належить також конфокальна та суперфлюоресцентна мікроскопія (роздільна здатність - 20-25 нм). Фірми "Zeiss", "Olympus" та інші випускають нові надсучасні мікроскопи з використанням лазерних промінів та ефекту флюоресценції. Вони дозволили здійснювати скануючу лазерну мікроскопію і вивчати не лише структуру мікробних клітин, а й локалізацію певних біополімерів і рух речовин через клітинну стінку та цитоплазматичну мембрану.

Культуральний метод діагностики заснований на одержанні чистої культури збудника з наступною його ідентифікацією, визначенням видової, а в окремих випадках, лише родової належності. Культуральний метод дослідження, порівняно з іншими, - метод ранньої діагностики. Виділити збудника можна з початку гострого періоду, а, подекуди, і з продромального періоду. Метод достовірний, дозволяє поставити остаточний діагноз. Реалізація культурального методу вимагає урахування деяких особливостей [3]: виділяти чисту культуру збудника поетапно (від забору матеріалу до ідентифікації збудника); як правило, використовують кілька різних середовищ, що дозволяє виділяти збудників з різними властивостями; культивування здійснюють у різних умовах, залежно від фізіології збудника, температури, pH, концентрації кисню, двоокису вуглецю в атмосфері, концентрації хлористого натрію в середовищі; ідентифікацію проводять з використанням сучасних біохімічних стрипів (API-20E, API10S, Rapid20E, ENTEROtest24, NEFERMtest24 та ін.); чутливість до антибіотиків визначають диско-дифузійним методом чи використовуючи МПК-тести та ТПК-тести; типування здійснюють, використовуючи чутливість до діагностичних бактеріофагів, особливостей антигенної структури збудників, ферментативної активності та чутливості до антибіотиків.

Є декілька застережень щодо використання цього методу: відомі бактерії, які важко культивуються, або змінюють свої антигенні властивості, чи які культивувати неможливо; час отримання результатів дослідження коливається від кількох діб до кількох тижнів; складність інтерпретації результатів дослідження при опортуністичних інфекціях.

Для одержання чистої культури (ізоляту) вірусів, рикетсій, хламідій використовують інфікування тварин, курячих ембріонів, культури клітин (первинно-трипсинізованих, пасажних та диплоїдних штамів) [2]. Розмноження вірусів у курячих ембріонах визначають за такими показниками: загибеллю чи недорозвитком ембріона, появою бляшок на хоріоналантоїсній оболонці, явищами капіляротоксикозу та постановкою реакції гемаглютинації з рідинами ембріона.

Розмноження вірусів в культурах клітин визначають за цитопатичним ефектом, здатністю до бляшкоутворення, реакцією гальмування метаболізму клітин, появи внутрішньоклітинних включень, реакціями гемаглютинації і гемадсорбції. При можливості здійснюють електронно-мікроскопічне дослідження вірусів у клітинах та культуральній рідині. Отриманий ізолят вірусу ідентифікують в серологічних реакціях. Можливе використання полімеразної ланцюгової реакції. В ряді випадків в культурах клітин виявляють вірусі антигени. Для цього використовують моноклональні антитіла. В цілому, виділення вірусу, його ідентифікація процес тривалий, складний, трудомісткий.

Імунологічні методи діагностики реалізуються в кількох напрямках: 1. Серологічна діагностика. 2. Виявлення алергічної перебудови організму хворого. 3. Виявлення специфічних антигенів збудника в матеріалі хворого.

Серологічна діагностика - виявлення в сироватці крові хворого специфічних антитіл до збудника інфекції. Для цього використовують як традиційні серологічні реакції - аглютинації, зв'язування комплементу, пасивної (непрямої) гемаглютинації та інші, так і сучасні методи - імуноферментний аналіз (ІФА), радіоімунний аналіз (РІА), тощо. Серологічна діагностика, як метод, має певні переваги: достовірність результатів, відносна простота, доступність. Є декілька зауважень щодо цього методу: при проведенні дослідження слід враховувати фазність імунної відповіді. Сьогодні визначають не лише наявність титру антитіл в його діагностичних значеннях, а й диференціюють класи імуноглобулінів (IgM, IgG). Раніше для цього використовували редукуючі агенти (2-меркаптоетанол, цистеїн). У теперішній час здійснюють реакцію ІФА з використанням моноклональних антитіл до IgM; враховують можливість перехресних реакцій у збудників, що належить до однієї родини чи роду; при постановці серологічного діагнозу у вірусології використовують принцип "парних сироваток": для дослідження беруть дві проби сироваток - першу на початку захворювання, а другу - через 1,5-2 тижні. Про наявність захворювання свідчить зростання титру антитіл в 4 і більше разів.

Методи алергічної діагностики ґрунтуються на виявленні в організмі хворого інфекційної алергії, яка формується за типом реакції гіперчутливості сповільненого типу. Застосовують внутрішньошкірні проби з введенням алергену при туберкульозі, бруцельозі, токсоплазмозі, туляремії, деяких мікозах. В останні десятиліття розробляють клітинні методи визначення сенсибілізації організму.

Для виявлення специфічних антигенів збудника безпосередньо в матеріалі хворого найчастіше застосовують високо чутливі серологічні реакції з міченими антитілами, наприклад, реакцію імунофлюоресценції, імуноферментний аналіз, радіоімунний аналіз.

Реакцію імунофлуоресценції широко використовують в бактеріології, вірусології, для виявляння збудників особливо небезпечних інфекцій. Імуноферментний аналіз дозволяє діагностувати вірусний гепатит В, СНІД, сказ тощо. Можливе виявлення токсигенності збудника дифтерії.

Як один із варіантів використання методу визначення антигенів є постановка зустрічного електрофорезу для виявлення і серологічної ідентифікації менінгококів при епідемічному цереброспінальному менінгіті.

Біологічний метод ґрунтується на використанні піддослідних тварин з метою відтворення інфекційного процесу в модельних умовах [4]. Біологічний метод використовують для дослідження матеріалу від хворого чи виділеної чистої культури збудника. Він дає можливість не лише проставити діагноз, але й вивчити особливості патогенезу захворювання. До різних збудників захворювань проявляють чутливість різні лабораторні тварини. Тому мікробіологічний віварій досить різноманітний. У певних випадках він може містити екзотичні тварини. В дослідах використовують не лише дорослих тварин, а й, наприклад, новонароджених мишей.

Метод не універсальний. Існують захворювання людини, при яких немає відповідної моделі на тварині, або вона недостатньо розроблена. До позитивних сторін використання цього методу слід віднести можливість оцінки ефективності хіміопрепаратів, вакцин, імуномодуляторів. Метод дозволяє вивчити токсигенність збудників, їх алергенну активність. Використовуючи метод, можна виділяти збудники інфекційних захворювань не лише від хворої людини, а й зовнішнього середовища.

Генетична діагностика - це виявлення в матеріалі від хворого або у виділеній чистій культурі збудників специфічної ділянки нуклеїнової кислоти, характерної лише для конкретного мікроорганізму [1, 5]. Використовують полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). В основі ПЛР знаходиться процес ампліфікації - багаторазового копіювання певної ділянки ДНК. Таким чином, можна одержувати мікрограми ДНК- копій, сегментів ДНК чи РНК, навіть, коли вони присутні у вигляді однієї молекули. ПЛР здійснюється in vitro з використанням ДНК-полімерази і олігонуклеотидних праймерів, які комплементарні двом 3`- кінцям ділянок, що обмежують потрібний сегмент ДНК. Праймери отримують шляхом хімічного синтезу з використанням ДНК-синтезаторів. Багато потужних фірм світу випускають тест-системи для ПЛР.

ПЛР має циклічний характер. Кожний цикл складається з 3 етапів: денатурація чи "плавлення" ДНК - роз'єднання ланцюгів при 95°С; зв'язування праймерів з 3`-кінцями ланцюгів ДНК при 55°С; елонгація або подовження ланцюгів при 72°С.

Цикл багаторазово повторюється. Ампліфіковану нуклеїнову кислоту виявляють після електрофорезу в агарозному гелі. ПЛР як високоефективний метод дає можливість отримати результат незалежно від здатності мікроорганізмів культивуватися. Він має високу чутливість (10-$10^3$ клітин / на пробу), відносну швидкість аналізу та кількісну оцінку.

Застосовують метод для діагностики великої кількості інфекції. Особливо важливий метод в діагностиці ВІЛ-носійства, СНІДу, TORCH-інфекцій та інших.

Широкому розповсюдженню методу заважає використання дороговартісного обладнання, складність методики. Перелік ампліфікаційних технологій сьогодні не обмежується лише ПЛР. Використовують лігазну ланцюгову реакцію (для виявлення збудників туберкульозу, хламідій, та інших ДНК-вмісних мікроорганізмів), риботипування та опосередковану транскрипцією ампліфікацію рибосомальної РНК та інші.

До генетичних методів діагностики також належить секвенування нуклеїнової кислоти (НК). Для цього синтезують комплементарні ланцюги НК з міченими флуоресцентною міткою нуклеотидами. Потім у секвенаторі здійснюють індикацію послідовності нуклеотидів в УФ-променях, переглядають цю послідовність на дисплеї

та порівнюють з відомими НК, які можна одержати з банку даних.

Для визначення метаболітів збудників інколи застосовують метод рідинної газової хроматографії для визначення специфічних компонентів збудника безпосередньо в матеріалі від хворого. Наприклад, визначають жирні кислоти бактероїдів та інших облігатних анаеробів, культивувати які дуже складно.

Патоморфологічний метод діагностики ґрунтується на виготовленні гістологічних препаратів з уражених тканин з наступним фарбуванням і мікроскопією. Використовують при актиномікозі, лепрі (гістологічні зрізи біоптатів шкіри та слизових), пріонових захворюваннях, сказі. При цитомегаловірусній інфекції в клітинах виявляють великі включення, а самі клітини нагадують "око сови".

## Висновки та перспективи подальших розробок

1. Постановка мікробіологічного (етіологічного) діагнозу є найважливішою ланкою сучасної доказової медицини.

2. Нові технології інтенсивно використовують для розробки та вдосконалення методів мікробіологічної діагностики інфекційної патології.

Разом із традиційними мікробіологічними та імунологічними методами діагностики інфекційних захворювань все частіше використовують досягнення молекулярної біології та генетики, що є потужним фактором розвитку мікробіологічної науки і неодмінно зумовлює необхідність у подальшому вдосконаленні викладання медичної мікробіології.

## Список літератури


1. Лопухов Л.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике /Л.В.Лопухов, М.В.Эльдельштейн //Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия.- 2000.- Т.2, №3.- С.96-106.
2. Посібник з медичної вірусології. [Гирін В.М., Порохницький В.Г., Вороненко С.Г. та ін.].- К.: Здоров'я, 1995.- 367с.
3. Рук-во по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Кн. 1 /Коллектив авторов; под ред. А.С.Лабинской, Е.Г.Волиной.- М. : БИНОМ.- 2008.- 1080с.
4. Саркисов Д.С. Воспроизведение болезней человека в эксперименте / Д.С. Саркисов, П.И.Ремезов.- М., 1960.- С.451-659.
5. Чухловин А.Б. Генодиагностика возбудителей инфекционных заболеваний и поиск специфических "генов риска" /А.Б.Чухловин, А.А.Тотолян //Клин. лаб. д-ка.- 2005.- №7.- С.21-36.
6. Широбоков В.П. Значення дисципліни "Мікробіологія, вірусологія та імунологія" для формування лікаря в сучасних умовах /В.П.Широбоков, В.Г.Войцеховський, А.І.Якименко // Biomedical and biosocial anthropology.- 2014.- №22.- С.245-247.


*Широбоков В.П., Войцеховський В.Г., Якименко А.И.*

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ ПРИ ПРЕПОДАВАНИИ МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ**

**Резюме.** *Микробиологическая диагностика является основой этиологического диагноза инфекционных болезней. Она основана на выявлении возбудителя, его генетического материала, метаболитов и реакции на него организма человека. Рассмотрены различные методы диагностики. Проанализированы их положительные и отрицательные стороны. Развитие микробилогической науки выступает мощным стимулом появления новых микробиологических методов исследования.*

**Ключевые слова:** *микробиологическая диагностика, иммунологические методы, полимеразная цепная реакция.*

*Shirobokov V.P., Voitsekhovsky V.G., Yakimenko A.I.*

**MICROBIOLOGICAL METHODS OF DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS PATHOLOGY AND THEIR ROLE IN TEACHING OF MEDICAL MICROBIOLOGY**

**Summary.** *Microbiological diagnostics is the base of the etiological diagnosis of infectious diseases. It is based on recognizing of the trigger, it's genetic material, metabolites and the reaction of human's organism on it. Different methods were examined. Their advantages and disadvantages were analyzed. The development of microbiological science is the powerful stimulus for appearing of new microbiological methods of research.*

**Key words:** *microbiological diagnostics, immunological methods, chain polymerized reaction.*

***Рецензент - д.мед.н., проф. Колесніков М.М.***

*Стаття надійшла до редакції: 28.10.2015 р.*

*Широбоков Володимир Павлович* - д.мед.н., професор, академік НАН та НАМН України, зав. кафедри мікробіології, вірусології та імунології НМУ ім. О.О.Богомольця; Shirobokov_bent@rambler.ru

*Войцеховський Валерій Григорович* - д.мед.н., проф. кафедри мікробіології, вірусології та імунології НМУ ім. О.О.Богомольця; val.voitsekhovsky@ukr.net

*Якименко Анатолій Іванович* - к.мед.н., доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології НМУ ім. О.О.Богомольця; +38 044 48-39-560