

Иммунологические методы исследования при холере

(теория)

Направления методов:

- Поиск Аг;
- Выявление Ат:
 - Агглютининов;
 - Вибриоцидных;
 - Токсиннейтрализующих.

Поиск АГ:

- Определение АГ в слайд-агглютинации с холерными сыворотками O1, O139, PO, Инаба и Огава;
- Подтверждение агглютинабельности культуры в объемной РА;
- Иммуно-суспензионный метод с эритроцитарными диагностикумами (РНГА, РТПГА, РНАг – системы реакций);
- Люминисцентно-серологический метод (МФА)
- Реакция иммобилизации вибрионов (РИВ).

Реакции, направленные на выявление АТ

- АТ выявляют в сыворотке больных, переболевших, вибрионосителей и вакцинированных.
- У больных холерой агглютинины, вибриоцидные и антитоксические АТ появляются на 5 – 7-й день болезни.
- Исследуют парные сыворотки с интервалом в 7 – 10 дней.

- Кровь для серологических исследований забирают из вены 1–5 мл, дают ей свернуться. Сыворотку инактивируют при 56° С 30 минут для разрушения компонента.
- Кровь из пальца 0,4 мл вносят в 1,6 мл ФР (разводят 1:5).
- Образцы крови и сыворотки сохраняют и транспортируют при 4° С.

Определение агглютининов в сыворотке крови

Ставится объемная РА.

- Исследуемую сыворотку разводят 1% ПВ рН $7,5 \pm 0,1$ двукратно в объеме 1 мл с 1:10 до 1:640.
- В пробирки с раститрованной сывороткой вносят по 1 капле культуры-АГ (3-х часовая бульонная культура), инкубируют при 37° 1 час и переставляют при 4° С до следующего дня.
- Ставят контроли АГ и сыворотки.

УЧЕТ: отмечают разведения с агглютинацией на 3-4 креста.

При положительном результате отмечается агглютинация в разведении 1:40 и выше.

Диагностическое значение имеет не менее, чем **4-х кратное** нарастание титра АТ при исследовании парных сывороток.

РНГА с АГ-м холерным эритроцитарным диагностикумом

Чувствительная двухкомпонентная
реакция. Выявляет полные АТ в
сыворотке крови.

Диагностический титр 1:40.

РНАг (реакция нейтрализации АГ)

- Выявляет полные и неполные АТ в сыворотке крови.
- Используется холерный иммуноглобулиновый эритроцитарный диагностикум.
- ПРИНЦИП: специфическая нейтрализация добавляемого АГ полными и неполными АТ.
- Диагностическое значение имеет не менее, чем 4-х кратное нарастание титра АТ при исследовании парных сывороток.

Определение антитоксических АТ в сыворотке крови

- Токсиннейтрализующие АТ появляются в крови на 5-6 день болезни, достигают максимальных значений на 14 – 21 дни, после чего их титры понижаются.
- Ставится РНГА с эритроцитарным холерным АГ-м энтеротоксическим диагностикумом (ЭХЭД).
Диагностический титр 1:160.

Определение вибриоцидных АТ в сыворотке крови

Обнаруживаются с 1 – 3 дня
болезни и достигают максимума к
10- 12 дню.

Принцип метода:

наличие вибриоцидных АТ
вызывает гибель клеток холерного
вибриона или тормозит их
размножение.

Ингредиенты:

- Исследуемая сыворотка, инактивированная прогреванием при 56°C 30 минут;
- **Комплемент** в разведении 1:20 ФР – м (коммерческий препарат или свежая сыворотка морской свинки);
- Физиологический р-р рН 7,2;
- **Штаммы холерных вибрионов** Инаба и Огава в S-форме, не чувствительные к комплементу.

Методика постановки реакции

- Комплемент 1:20 разливают в ряд пробирок по 0,9 мл;
- В 1-ю пробирку с комплементом вносят 0,1 мл исследуемой сыворотки и разводят десятикратно до разведения 10^{-10} степени;
- Титрацию проводят в штативе на льду;
- Готовят взвесь из 24-часовой агаровой культуры холерного вибриона концентрацией 10000 кл./мл в ФР;

- Во все пробирки с сывороткой вносят по 0,1 мл взвеси (1000 клеток);
- Предусматривают **контроли**:
 - контроль **культуры** (0,9 мл ФР + 0,1 мл культуры);
 - контроль **сыворотки** (0,8 мл ФР + 0,1 мл сыворотки + 0,1 мл культуры);
 - контроль **комплемента** (0,9 мл комплемента + 0,1 мл культуры).

- Для контроля взвеси делают высев из контроля культуры по 0,1 мл на 2 чашки ЩА (100 клеток);
- Штатив с пробирками помещают при 37° С на 1 час, затем вновь на лед;
- Из каждой пробирки отдельной пипеткой высевают по 0,1 мл на чашку ЩА и распределяют взвесь покачиванием;
- Чашки инкубируют при 37° С 18-24 часа;
- Подсчитывают число выросших колоний.

Вибриоцидный титр -

это максимальное разведение исследуемой сыворотки, которое вызывает гибель 50% клеток холерного вибриона в сравнении с количеством клеток, выросших на чашке с высевом из контроля комплемента (комплемент + культура).

Определение титра вибриоцидных АТ в сыворотке крови на основе ферментации углеводов

- Комплемент разводится 1:20 1% ПВ с сахарозой и индикатором Андреде.
- Сыворотку титруют в ряду пробирок с комплементом.
- Суспензию агаровой культуры холерного вибриона разводят 1% ПВ до концентрации 1000 кл./мл и вносят во все пробирки. Инкубируют при 37° 7 - 8 часов.

УЧЕТ:

- В контроле (среда + культура) за счет ферментации сахарозы холерным вибрионом содержимое пробирок окрашивается в **розовый цвет**.
- Изменение цвета в опытных пробирках является показателем отсутствия вибриоцидных АТ в данном разведении сыворотки.
- **За вибриоцидный титр принимается наибольшее разведение сыворотки, при котором цвет содержимого пробирки не изменяется.**

Определение копроантител.

- Секретируются клетками слизистой оболочки кишки (АОК).
- Реализуют иммунный ответ в кишечнике.

Метод М. С. Наумшиной и А. К. Адамова

- Делают мазки на предметных стеклах из взвеси холерных вибрионов концентрацией
- 1 млрд./мл (АГ), сушат и фиксируют спиртом;
- Исследуемые испражнения разводят 1:5 ФР, центрифугируют и титруют двукратно до 1:256 (АТ);
- Из каждого разведения делают мазки на стекла с АГ по 1 капле, промывают и высушивают;

- Третьим слоем наносят флюоресцирующие АТ против глобулинов кролика.
- После окраски мазки промывают, высушивают и просматривают в люминисцентном микроскопе.

УЧЕТ: при наличии копро-АТ вибрионы в мазке дают характерное свечение.

За титр принимают максимальное разведение материала, при котором отмечается специфическое свечение.

