

Экспресс- и ускоренные
методы выявления холерного
вибриона
(теория)

ПРОБЛЕМА



Экспресс-методы диагностики

связаны с выявлением
возбудителя в исследуемом
материале за короткий промежуток
времени – 5 – 6 часов.

Методы ускоренной диагностики

предполагают подращивание исследуемого материала, выявление в нем возбудителя и ускоренную идентификацию выделенной культуры: определение рода и вида микроорганизма.

Экспресс-методы:

- Метод флюоресцирующих антител (МФА);
- Иммуно-суспензионный с использованием эритроцитарных диагностикумов (РНГА);
- Реакция иммобилизации вибрионов холерными диагностическими сыворотками O1 и O139 серогрупп (РИВ);
- ИФА;
- ПЦР со специфическими праймерами.

МФА

- Используются холерные флюоресцирующие иммуноглобулины О1 и О139.
- Для гашения неспецифического свечения – препарат сывороточного бычьего альбумина, меченого родамином.
- Чувствительность метода: 500 т. – 1 млн. м. кл./мл.

Мазки готовят:

- Из нативного материала;
 - Из нативного материала после его концентрирования (вода);
 - Со смывов с чашек агара или с поверхности 4 – 5 мл 1% ПВ после подращивания при 37°.
- Для подращивания в ЩА добавляют стимулятор роста – 1% лизированной крови. Делают посев на 3 чашки ЩА, готовят смывы ФР-м с поверхности среды через 1, 3, 5 часов инкубации, из них – мазки и просматривают.

РНГА с эритроцитарным иммуноглобулиновым диагностикумом О1

- Ставится с обеззараженными при 100° С в течение 30 минут выделениями больного, рвотными массами;
- Сначала – в 2-х лунках: с цельным материалом и в разведении 1 : 2; при положительном результате реакция развертывается до 10 лунок;
- При наличии грубых взвешенных частиц материал фильтруют.
- Чувствительность метода: 500т.-1 млн. кл/мл.

Ускоренная диагностика холерного вибриона в материале от больного
Предполагается **высокая концентрация возбудителя в материале** (при тяжелой или алгидной форме холеры).

- Посев на чашки ЩА по 0,1 мл исследуемого материала «газоном» или в 4 – 5 мл 1% ПВ, инкубация при 37° С. Приготовление мазков со смывов с чашек или с поверхности 1% ПВ (МФА);
- РНГА со смывов с чашек или с поверхности 1% ПВ;

- **Постановка пробы на чувствительность к холерным б/фагам «с» и эльтор по Грациа.** Исследуемый материал вносится в 0,7% ПЖА в количестве 0,3 – 0,5 мл.

УЧЕТ пробы - через 2 – 3 часа инкубации при 37° С. Наличие посторонней микрофлоры создает мутноватый фон – четкие пятна лизиса отсутствуют.

- **Объемная РА в 1% ПВ** с холерными сыворотками О1, Инаба и Огава с 1:100 до титра (сыворотки также разводят 1% ПВ). **УЧЕТ** через 1,5 - 2 часа инкубации при 37° С. Фиксируют мелкий агглютинативный рост на дне пробирок с помощью лупы.

- **Определение группы Хейберга.**
Нативный материал вносят по 1-2 капли в жидкие среды Гисса с сахарозой, маннозой, арабинозой.

Учет через 3 – 6 часов инкубации при 37° С.

Параллельно ведут анализ по классической схеме исследования: выделение чистой культуры и ее идентификация.

Методы обнаружения холерного вибриона в воде

- Воду фильтруют через мембранные фильтры №№ 2 – 3;
- Через фильтр пропускают до 50 мл воды;
- Пробу делят на 3 объема и пропускают через 3 фильтра;
- Два фильтра помещают на 2 чашки ЩА для подращивания культуры при 37° С на 3 и 4 часа; 3-й – в чашку Петри для приготовления мазков для МФА.

С фильтров на ЩА после подращивания культуры также готовят мазки для МФА.

- Посев материала с фильтра на ЩА для получения изолированных колоний и в 1% ПВ для накопления;
- При достаточном количестве материала – постановка РНГА с соскоба с фильтра или со смыва с ЩА после обеззараживания взвеси.
- **Параллельно ведется исследование по классической схеме.**

Спасибо за внимание!

