**Владивостокский Государственный Медицинский Университет**

**Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии**

**Реферат**

**Холера**

**Выполнил: Новак А.Л.**

**301 гр. л/ф**

**Владивосток, 1998.**

**Этиология**

Возбудитель холеры относится к роду Vibrio. Это изогнутая, грамотрицательная, не образующая споры палочка, имеющая один полярно расположенный жгутик. По чувствительности к специфическому фагу (IV тип по Мукерджи) различают два биотипа холерного вибриона — классический (возбудитель азиатской холеры) и Эль-Тор. Каждый из них по 0-антигену подразделяется на 3 серологических типа: Огава (АВ), Инаба (АС) и редко встречающийся Гикошима (АВС), который некоторые авторы рассматривают как вариант серотипа Огава. Н-антиген холерных вибрио­нов — общий для всех серотипов.

Холерные вибрионы образуют термолабильный экзотоксин — холероген (относительная молекулярная масса — 82—84 кд). Он состоит из комплекса тяжелой субъединицы А, активирующей аденилатциклазу, и субъединицы В, представленной 4—6 легкими цепями и обеспечивающей связывание холеро-гена с рецепторами эпителиальных клеток тонкой кишки.

**Биолого-патогенетические свойства возбудителя**

Миновав желудочный барьер, вибрионы попадают в тонкую кишку с благо­приятной для них средой и заселяют (колонизируют) поверхность кишечного эпителия. Процесс колонизации включает в себя хемотаксис вибрионов к слою слизи, покрывающему верхушки ворсинок тонкой кишки, проникно­вение через эту слизь, адгезию к рецепторам на исчерченной каемке кишеч­ных эпителиоцитов и размножение на поверхности эпителия ворсинок и крипт. У больных холерой возбудитель может быть обнаружен на всем про­тяжении желудочно-кишечного тракта. В желудке при рН не менее 5,5 виб­рионы не обнаруживаются, в стуле их концентрация достигает 106—107 (иногда ^—Ю9).

Размножившись до определенной концентрации, возбудитель вызывает заболевание посредством вырабатываемого им холерогена. Основную роль в развитии болезни играют вибрионы, которые находятся в тесной связи со слизистой оболочкой тонкой кишки, так как они выделяют холероген в непо­средственной близости от его рецепторов на эпителиальных клетках — ган-глиозида GM1. После прикрепления холерного токсина к ганглиозиду субъ­единица А проходит через мембраны внутрь эпителиальной клетки, где про­исходит высвобождение фрагмента А1. Последний энзиматически расщеп­ляет НАД и передает его АДФ-рибозную половину на регуляторный протеин аденилатциклазного комплекса, находящегося на внутренней стороне мем­браны эпителиоцита. В результате происходит активация аденилатциклазы, приводящая к повышению содержания цАМФ — одного из внутриклеточ­ных стимуляторов кишечной секреции. Связывание холерного токсина с ре­цепторами на эпителиальных клетках происходит чрезвычайно быстро (через 1—3 мин); биохимические нзменения в клетке являются необратимыми.

Возникающее заболевание сопровождается потерей огромных количеств жидкости с низким содержанием белка и высокой концентрацией ионов нат­рия, калия, хлоридов, гидрокарбонатов. Эта жидкость по составу отличается как от экссудата, так и от транссудата и ближе к составу кишечного секрета.

**Восприимчивость**

К холерному вибриону восприимчивы люди всех воз­растов. Чаще и тяжелее болеют холерой лица, злоупотребляющие алкоголем или перенесшие резекцию желудка. Кислотность желудочного сока играет важную роль в определении минимальной инфицирующей дозы — в опытах на добровольцах при нейтрализации желудочного сока гидрокарбонатом натрия количество вибрионов, необходимых для воспроизведения специфи­ческого процесса у человека, уменьшается с 10" до 104—*10Ь* микробных клеток.

**Клинические особенности**

Инкубационный период при холере длится от 1 до 5 дней. Клинические проявления холеры весьма варьируют, и тяжесть клинического течения определяется степенью обезвоживания. Заболевание начинается обычно внезапно. Первым клинически выраженным признаком холеры является понос. Типичные холерные испражнения представляют собой водянистую, мутновато-беловатую жидкость с плавающими хлопьями, напоминают по внешнему виду рисовый отвар и не имеют запаха. Мышечная слабость и судороги в икроножных мышцах — ранние симптомы холеры. Вслед за жидким стулом появляется обильная повторная рвота, быстро при­водящая к декомпенсированному эксикозу. Кожные покровы становятся цианотичными, холодными на ощупь, черты лица заостряются, глаза и щеки западают. Кожа кистей рук морщинистая («руки прачки»), голос сиплый, вплоть до афонии. У больных с тяжелой формой холеры отмечается гипо-термия. Из-за ее постоянства терминальная форма холеры (IV степень дегид­ратации) получила название «алгидная». Алгид (декомпенсированное обез­воживание) сопровождается нарушением деятельности основных систем организма — сердечно-сосудистой, дыхательной, мочевыделительной.

**Иммунологическая диагностика**

Обнаружение антигена. Возбудитель холеры и его специфические антигены (корпускулярный, раст­воримый, холероген) выявляют в фекалиях, рвотных массах, крови, дуоде­нальном и кишечном содержимом, желчном пузыре, в объектах окружаю­щей среды (смывы с различных предметов), в воде открытых водоемов, сточ­ных водах, гидробионтах и др.

Из современных методов индикации антигенов холерного вибриона наи­большее распространение получила РНГА, чувствительность которой с анти­тельными эритроцитарными диагностикумами составляет 105—101' бактерий в 1 мл или 0,04 мкг/мл 0-антигена. При клинически выраженных формах холеры, когда в испражнениях больных содержится огромное количество вибрионов (10'—109 в 1 мл), прямое исследование фильтратов прогретых на водяной бане испражнений в РНГА с антительным диагностикумом позво­ляет дать ответ о наличии специфического антигена уже через 2-—3 ч. Рвот­ные массы больных, испражнения вибриононосителей и контактных лиц, со­держащие меньшее количество вибрионов, целесообразно исследовать после предварительного 6-часового подращивания на 1% пептонной воде. При ис­следовании испражнений и рвотных масс оказалось, что лишь в 52% случаев диагноз холеры был подтвержден бактериологически у больных, в анамнезе значительной части которых имелось указание на употребление антибиоти­ков при появлении первых признаков заболевания. С помощью РНГА забо­левания холерой удалось дополнительно установить еще у 21 % больных [По­ляков И. И. и др., 1973]. При исследовании испражнений, содержимого ки­шечника и желчного пузыря умерших от острых кишечных заболеваний, испражнений здоровых лиц и проб воды обычно в практических условиях наблюдали полное совпадение результатов серологического и бактериологи­ческого методов исследования, что позволяет считать РНГА с антительным эритроцитарным диагностикумом достаточно надежным экспресс-методом при массовом обследовании на холеру.

Некоторыми авторами при индикации специфических антигенов холер­ного вибриона отдается предпочтение РТНГА. Холерные диагностикумы для этой реакции готовят из бараньих или человеческих О (I) группы эритроци­тов, сенсибилизированных холерными 0-антигенами. Чувствительность ме­тода — 104—106 бактерий в 1 мл при исследовании нативных испражнений и 10'—105 — после предварительного подращивания. Минимальное коли­чество 0-антигена, выявляемого с помощью РТНГА, равно 0,04—0,16мкг/мл. РТНГА дает положительные результаты у 91% больных холерой, у 40% ре-конвалесцентов и 12% контактировавших с больными, 0-антиген холерного вибриона может быть определен через 1 мес от начала заболевания в фека­лиях у всех переболевших людей, а спустя 5—6 мес — у половины обследо­ванных, что, по-видимому, свидетельствует о более длительной экскреции специфического антигена в нежизнеспособной форме. Совпадение результа­тов бактериологического метода и РТНГА, по различным данным, наблюда­ется в 63—100% случаев. Имеющиеся материалы дают основание считать целесообразным широкое испытание РТНГА.

Положительную оценку при диагностике холеры получил МФА, позво­ляющий выявлять холерные вибрионы при содержании их не менее 10° в 1 мл. Использовать МФА целесообразно при исследовании нативного ма­териала от больных и трупов. У больных холерой положительные результа­ты с помощью МФА были получены в течение 2 ч в 70—90% наблюдений при полном совпадении с результатами бактериологического анализа. При­менение МФА при исследовании воды и смывов возможно лишь после пред­варительного подращивания или концентрирования материала. Представ­ляется перспективным использование иммунотушевой окраски холерных вибрионов.

Для выявления антигенов холерного вибриона применяют агрегат гемаг-глютинационную пробу (АГГ). В основе её лежит использование для агрега­ции и фиксирования белков иммунной сыворотки на эритроцитах химиче­ского вещества из группы диазосоединений в виде препарата диазоль черно­го С. Эритроциты, сенсибилизированные агрегированными белками холер­ной 0-сыворотки, обладают высокой специфичностью и чувствительностью. С их помощью удается определить 0,01—0,005 мкг/мл «цельного» раство­ренного антигена, приготовленного по методу Буавена, и 4000—480 000 кле­ток холерного вибриона в микробных взвесях. Это позволяет считать АГГ од­ним из наиболее чувствительных иммунологических методов, который оп­равдал себя при обследовании людей. С помощью АГГ 0-антиген холерного вибриона обнаружен в 88,2% больных холерой и 78,3% вибриононосителей, причем в титрах 1 : 40 и выше 0-антиген определен у 76,1% больных и у 57,1% вибриононосителей. Серологически активный компонент эндотоксина обнаруживают в высоких титрах, чаще у тяжелых больных и в первые 3—5 дней болезни. В период реконвалесценции количество антигена в сыворот­ке крови снижается, но у 33% больных он сохраняется до 20—25 дней [По­кровский В. И., Малеев В. В., 1978]. Для определения холерогена, помимо биопроб, используют и иммунологические методы — РНГА и АГГ. В опытах с бесклеточными супернатантами культур холерных вибрионов порог чувст­вительности обоих методов составлял 0,01—0,005 мкг/мл.

Антительный ответ. Инфицирование человека холерным виб­рионом ведет к местному и системному ответу. Клинически выраженное за­болевание холерой сопровождается ростом уровня сывороточных антимик­робных (агглютинирующих и вибриоцидных) и токсиннейтрализующих ан­тител, как правило, уже к концу 1-й недели после появления симптомов бо­лезни. Агглютинины к холерному вибриону к 4-му дню заболевания выявля­ют у 35,7% больных, на 8-й день — практически у всех (98,6%). Уровень агглютининов достигает максимума на 2-й неделе заболевания (на 11—15-й день титры, равные 320 и выше, регистрируют у 71% больных), а затем резко падает. Титры вибриоцидных антител также увеличиваются к 8—10-му дню заболевания и после 3 нед (иногда несколько раньше) начинают снижаться, достигая первоначального уровня через 2—7 мес. У детей до 4 лет падение титра вибриоцидных антител происходит быстрее, чем в старшей возрастной группе (5—14 лет), достигая исходного уровня уже через 3 мес. Динамика титров токсиннейтрализующих антител имеет сходный характер — появ­ляясь в конце 1-й недели, они достигают максимума между 2-й и 3-й неделя­ми, а с 21-го дня снижаются.

Содержание сывороточных IgM и I *gG* на протяжении болезни сопоста­вимо с аналогичными показателями в контрольной группе, хотя есть данные об увеличении уровня IgM в острой стадии и снижении его в период рекон­валесценции. Некоторые исследователи не установили разницы в содержа­нии IgA при поступлении больных в стационар и в стадии реконвалесцен­ции; другие отмечают повышение его уровня у переболевших [Покров­ский В. И., Малеев В. В., 1978; Адамов А. К., 1981]. Сказанное не дает доста­точных оснований утверждать, что изменение уровня сывороточных иммуно-глобулинов при холере носит специфический характер.

Специфическая активность иммуноглобулинов различных классов зави­сит от формы и длительности инфекционного процесса при холере. Антитела в сыворотке крови переболевших относятся, преимущественно к IgM. У виб­риононосителей продуцируются, наоборот, высокоактивные IgG-антитела. Активность IgA-антител в сыворотке крови вибриононосителей незначитель­но выше по сравнению с больными. Чем тяжелее протекает заболевание, тем выше активность продуцируемых антител, относящихся к иммуноглобули-нам класса М, и ниже активность IgG-антител.

Самым простым и легко воспроизводимым методом определения анти­микробных антител является РА с живыми культурами холерного вибриона, но чувствительность этой реакции ограничена. Диагностические титры (1 : 40 и выше) появляются, как правило, к концу 1-й недели заболевания, но лишь у 19,7% больных холерой. Исследование парных сывороток, получен­ных с интервалом 7—10 дней при наличии 4-кратного и более нарастания титров антител увеличивает частоту положительных результатов до 89,6%

Гораздо большее значение придается в настоящее время выявлению виб-риоцидных антител. Вибриоцидный тест (ВТ) является более чувствитель­ным в сравнении с РА, давая высокие титры, особенно у реконвалесцентов холеры (до 1 : 100 000). Нужно, однако, иметь в виду, что вибриоцидные ан­титела (титры до 1:1000) могут обнаруживаться и в сыворотках невакцини­рованных здоровых людей, никогда не болевших холерой, и у лиц, инфици­рованных бруцеллами, Yersinia enterocolitica 09, цитробактером. Агглюти­нины относительно меньше чувствительны к такой неспецифической стиму­ляции. Как и **РА,** ВТ позволяет регистрировать подъем специфических анти­тел (4-кратный и более) у 90—95% больных с бактериологически подтвер­жденным диагнозом холеры [Watanabe Y., 1974].

В качестве антигена в РА и ВТ используют холерные вибрионы обоих серотипов. При необходимости пользоваться одним предпочтение отдают серотипу Огава, который чаще, чем Инаба, вступает в перекрестные реакции с гетерологичным серотипом холерного вибриона и реже дает неспецифиче­ские реакции с микробами других семейств.

Хотя эти серологические реакции являются наиболее чувствительными, необходимость применения в них живых вибрионов создает определенные трудности при массовых обследованиях. Поэтому наибольшего внимания за­служивают антигенные эритроцитарные диагностикумы, которые позволи­ли внедрить в практику РНГА и РТНГА. Эти реакции обладают достаточной чувствительностью и специфичностью, позволяя обнаруживать антитела у больных и переболевших холерой в титрах 1 : 640—1 : 1280. Наблюдае­мые различия в титрах при параллельном использовании РНГА и ВТ обус­ловлены главным образом различиями в физико-химической природе выяв­ляемых антител: IgG-антитела более эффективно обнаруживают бактери­цидным методом (ВТ), IgM-антитела — в РНГА.

Для выявления антитоксинов в сыворотках применяют РН, результаты которой учитывают по отсутствию холерогенного эффекта в перевязанной петле тонкой кишки взрослых кроликов, в кишечнике крольчат-сосунков, на коже морских свинок (кроликов) в опытах in vivo и по отсутствию цитото-нического действия в культуре клеток СНО и Y-1 — в опытах in vitro. Наибо­лее стандартизованы кожная проба и модель перевязанной кишечной петли. У 73% больных в эндемичном по холере районе с помощью кожной пробы выявлено диагностически значимое 9-кратное и большее увеличение титров токсиннейтрализующих антител. Частота сероконверсии вибриоцидных ан­тител и агглютининов в этой же группе больных была выше и составила 98 и 88% соответственно [Watanabe Y., 1974].

Анализ титров антитоксических антител при диареях нехолерной этио­логии показал, что в пробах сывороток, взятых в острой стадии болезни, они колебались от << 10 до 270, но значимое нарастание титров в период рекон-валесценции было отмечено лишь у 2,5% больных. Обладая высокой специ­фичностью, метод определения токсиннейтрализующих антител несколько уступает по чувствительности методам определения вибриоцидных и агглю­тинирующих антител. Высокой разрешающей способностью обладают ИФМ и РИМ, использующие меченный энзимом или радиоактивным веществом антиген и позволяющие определять связывание 0,001—1 нг иммунного белка исследуемой сыворотки.

Титры антитоксических антител, регистрируемые ИФМ, выше титров, которые определяются с помощью внутрикожного теста, что обусловлено различиями в выявляемых классах иммуноглобулинов: кожный тест доку­ментирует нейтрализующую активность только IgG-антител, вероятно, в си­лу их большей авидности, в то время как ИФМ регистрирует и уровень IgM-антител.

Таким образом, изучение титров и динамики нарастания циркулирую­щих антител в сыворотках крови больных при холере расширяет возможно­сти ее лабораторной диагностики. Ретроспективный диагноз холеры с боль­шей степенью вероятности может быть установлен в РА и ВТ, но лишь на ос­новании изучения парных сывороток больных. Определение уровня антиток­сина полезно в тех случаях, когда необходимо исключить предшествующую специфическую вакцинацию, так как антитела этого типа не индуцируются существующими холерными вакцинами и очень редко встречаются у здоро­вых людей. Однако подъем антитоксических титров у больных на фоне диаг­ностически значимой сероконверсии вибриоцидных и агглютинирующих антител повышает достоверность серологической диагностики холеры.

Возникновение патологического процесса, вызванного холерными виб­рионами, ведет к появлению антител к этим микроорганизмам и во внеш­них секретах пищеварительного тракта — интестинальной жидкости (ко-проантитела) и слюне. Отличительной чертой динамики копроантител яв­ляется их раннее появление (у 72% — на 2—3-й день болезни, у 100% — на 4-й день) и быстрое исчезновение из кишечного содержимого. В интестиналь­ной жидкости выздоравливающих от холеры людей антитела против виб­рионов относятся к иммуноглобулинам A, G и М, но преобладающими явля­ются SIgA-антитела, количество которых у больных холерой возрастает примерно в 30 раз, но составляет около '/4 того, что наблюдается у больных диарейными заболеваниями нехолерной этиологии. Последнее связано с адсорбцией SIgA на холерных вибрионах, что приводит к стойкому сниже­нию количества вибрионов в стуле больных и сокращает продолжительность их выделения из кишечника. Концентрация этого иммуноглобулина и время его появления в кишечном содержимом не связаны с сывороточным IgA. Количество IgG- и IgM-антител в кишечном содержимом реконвалесцентов холеры также увеличивается (в 5—7 раз), но в фекалиях антитела класса IgM не обнаруживают.

Для обнаружения антител в интестинальной жидкости и фекалиях боль­ных могут быть использованы ВТ, РИМ с холерными антигенами, меченны­ми радиоактивным йодом, непрямой флюоресцентно-серологический метод. Нарастание специфических антител указывает на наличие заболевания хо­лерой. Однако кишечно-копрологическая диагностика холеры еще недоста­точно разработана.

В слюне больных и вибриононосителей повышен уровень IgA и IgG. Одновременно появляются и специфические антитела (агглютинины), содер­жание которых у больных холерой выше, чем у виброноносителей (30 АЕ и 14 АЕ соответственно). Диагностический титр специфических агглютини­нов слюны может оказаться значительно ниже сывороточного.

Определению состояния повышенной чувствительности при холере в реакции ГЗТ посвящены единичные работы. Описаны положительные ал­лергические реакции у 89% переболевших холерой и вибриононосителей (при отсутствии их в контрольной группе) в ответ на внутрикожное введение аллергена из убитых холерных вибрионов. Однако имеющихся данных не­достаточно, чтобы высказать суждение об аллергической перестройке орга­низма при холере или о диагностической значимости применяемых тестов.

**Иммунитет**

После болезни у человека вырабатывается выраженный им­мунитет, который сохраняется длительное время, поэтому случаи повторных заболеваний холерой крайне редки. Опыты на добровольцах показали, что в течение 3 лет (срок наблюдения) люди, переболевшие холерой в результате экспериментального заражения, оставались устойчивыми к повторному за­ражению холерными вибрионами [Levine M. et al., 1981].

Основная роль в иммунитете к холере принадлежит антителам, проду­цируемым местно (в кишке), хотя определенный вклад в защиту вносят цир­кулирующие антитела при высоких их концентрациях, когда они проникают в просвет кишки из крови, что подтверждено экспериментами на животных. Более высокий уровень защиты наблюдается при синергическом действии антибактериальных и антитоксических антител в кишке. Основная роль ан­тибактериальных SIgA состоит в том, чтобы препятствовать хемотаксису вибрионов к эпителию и прилипанию их к поверхности слизистой оболочки кишечника в результате блокирующего действия на структуры для прилипа­ния (лиганды) на поверхности бактериальных клеток. Снижение колониза­ции и адгезии холерных вибрионов способствует более быстрому их выведе­нию из кишечника при перистальтике и тем самым уменьшает возможность приживления возбудителя в кишечном тракте.

Действие кишечных IgA-антител против холерогена обусловлено глав­ным образом блокадой его В-субъединицы, что препятствует связыванию токсина с ганглиозидом GM1 на поверхности эпителиоцитов. Антитела, бло­кирующие токсический сайт на А-субъединице холерогена, оказывают мень­шее защитное действие.

**Список использованной литературы**

1. 1.     Л.Б. Хазенсон, Н.А. Чайка: Иммунологические основы диагностики и эпидемологического анализа кишечных инфекций. «Медицина»,1987.
2. 2.     В.Д. Тимаков, В.С. Левашев, Л.Б.Борисов: Микробиология. «Медицина», 1983.
3. 3.     Лекция по теме.
4. 4.     Методическая разработка кафедры.