

Serološka diagnostika pertusisa

Povzročitelj pertusisa — oslovskega kašlja *Bordetella pertussis* (Bordet-Gengou, 1906) izloča med razmnoževanjem na gojiščih in med infekcijo v gornjih dihalih več različnih antigenov. Pri povzročitelju so dokazali topljive antigene, ki zbujaajo v organizmu imunsko odzivnost. Pri razgradnji odmrlih povzročiteljev pa se sprošča endotoksin — nukleoprotein, ki povzroča preobčutljivostno reakcijo. Na imunski odziv nastala protitelesa aglutinini, hemaglutinini, komplement fiksirajoča protitelesa in druga pa je mogoče dokazovati ter jih tako s pridom izkoristiti v serološki diagnostiki tega obolenja.

Navajamo serološke preiskavne metode za dokazovanje količine (titra) specifičnih protiteles, ki jih je mogoče uporabiti za dokaz prisotnega ali prestanega obolenja:

- a) mikroskopski dokaz *B. pertussis* z imunofluorescenčno tehniko,
- b) dokazovanje specifičnih protiteles — aglutininov z reakcijo aglutinacije,
- c) dokazovanje komplement-fiksirajočih protiteles z reakcijo vezanja komplementa,
- č) dokazovanje specifičnih protiteles z imunofluorescenco,
- d) opsoninski test.

Dokazovanje *B. pertussis* z imunofluorescenčno tehniko sodi med zgodnjo diagnostično metodo, s katero je mogoče že v začetku obolenja dokazati povzročitelja. Iz kužnine, odvzete s pernazalnim nazofaringalnim brisom, naredimo direktni razmaz in delujemo nanj z antiserumom (IgG). Protitelesa antiseruma, markirana s fluoresceinizotiocianatom, se vežejo na antigenske determinante bakterijske celice. Tako pripravljene razmaze opazujemo v mikroskopu z ultra vijolično osvetlitvijo. Povzročitelji oslovskega kašlja, ki so nase vezali markirana protitelesa, zasvetijo v mikroskopski sliki rumeno zeleno.

Druge metode za dokazovanje specifičnih protiteles — reakcije aglutinacije, reakcije vezanja komplementa in imunofluorescence — je mogoče uporabiti šele 10. do 15. dan obolenja, ko se je količina protiteles povečala v organizmu.

Z reakcijo aglutinacije dokazujemo količino — titer aglutininov — v bolnikovem serumu. Dvojnimi razredčinami seruma v epruvetah 1 : 2,5, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 itd. v količini po 0,1 ml dodamo enako količino suspenzije povzročitelja (antigena), s čimer vsako razredčenje seruma podvojimo ter končno dobimo razredčenje: v prvi epruveti 1 : 5, v drugi epruveti 1 : 10 itd. Izdelane reakcije tresemo 3 minute in inkubiramo 1 uro pri 37° C. Končno dodamo vsebini vsake epruvete še po 0,1 ml fiziološke raztopine natrijevega klorida ter pustimo čez noč v hladilniku pri 4° do 6° C. Aglutinini polarno zlepljajo bakterijske celice,

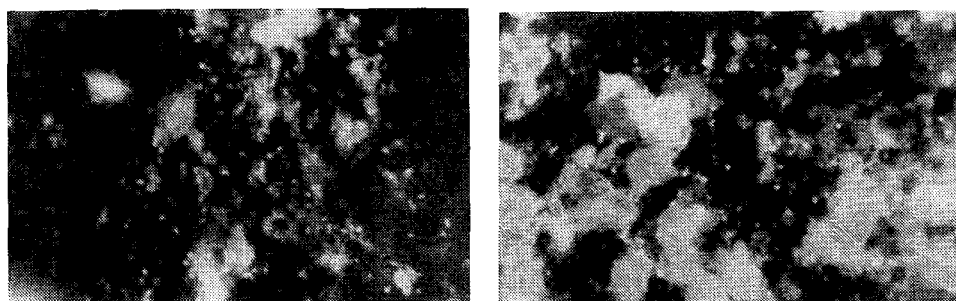
aglutinate dobro vidimo s prostim očesom, bolj pa pod aglutinoskopom. Titri, ki so višji od 1 : 20, so lahko dokaz obolenja.

Z reakcijo vezanja komplementa ugotavljamo komplement fiksirajoča protitelesa (IgM) in njih količino (titer). Koncentriranemu serumu in dvojnimi razredčinam inaktiviranega bolnikovega seruma dodajamo enake količine antigena in komplementa. Test inkubiramo 18 ur pri temperaturi 6° do 8° C, da omogočimo vezavo komplementa na kompleks antigen-protitelo. V nadaljevanju pozikusa ugotavljamo prosti (nevezan) in vezan komplement s tem, da dodamo ovčje eritrocite, senzibilizirane s specifičnim hemolizinom, ki lizira eritrocite v vseh epruvetah, kjer je na voljo komplement. Prisotnost komplementa v tej reakciji je dokaz odsotnosti protiteles, medtem ko vezani komplement dokazuje, da so v serumu prisotna protitelesa.

Navzočnost in količino protiteles v serumu pa lahko dokazujemo tudi z imunofluorescenčnim testom. V ta namen uporabljamo fluorescenčna barvila (npr. fluoresceinizotiocianat), s katerimi oznamujemo (markiramo) molekule protiteles, ki se nato vežejo na specifični antigen.

Opsoninski test uporabljamo za izračunanje opsoninskega indeksa. Z indeksom je izražena sposobnost bolnikovega seruma za stopnjo odpornosti oziroma fagocitoze proti povzročitelju obolenja.

V času od 1. februarja 1974 do 15. maja 1975 smo v Inštitutu za mikrobiologijo medicinske fakultete v Ljubljani pregledali z reakcijo aglutinacije in z reakcijo vezanja komplementa (RVK) 470 bolnikovih serumov glede na protitelesa *B. pertussis*. Rezultate pregledov prikazujeta tabeli 1 in 2.

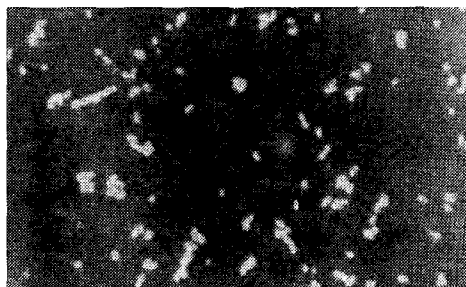


Slika 1 in 2: Mikroskopski posnetek *B. pertussis* (po Gramu negativni kokobacili) v razmazu iz transnazalnega nazofaringalnega brisa (slika 1) in razmazu iz peritonealne eksudata miške (slika 2) prikazana s fluorescentno tehniko

Tabela 1. Prikaz rezultatov seroloških pregledov serumov glede na protitelesa *B. pertussis* z reakcijo aglutinacije

Aglutinacijski titri							Negativni serumi	Število serumov
1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320		
54	75	37	27	29	20	1	227	470

Pri 168 bolnikih smo poleg seroloških pregledov kultivirali tudi transnazalni nazofaringalni bris na gojišču po Bordet-Gengouju. V 73 primerih smo iz brisov izolirali *B. pertussis*. Pri teh bolnikih smo z reakcijo aglutinacije dokazali aglutinine v 30 primerih, v 32 primerih pa komplement fiksirajoča protitelesa v povečanem titru.



Slika 3: Mikroskopski posnetek čiste kulture *B. pertussis*, na katero so delovala fluorescentna protitelesa. V mikroskopski sliki z ultra vijolično osvetlitvijo so povzročitelji pertusisa obarvani rumenozeleno

Tabela 2. Prikaz rezultatov seroloških pregledov serumov glede na protitelesa *B. pertussis* z reakcijo vezanja komplementa

reaktivni	Titer protiteles v serumu						Nereaktivni	Antikomplementarna	Število serumov
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64			
32	33	44	51	35	21	4	248	2	470

Zaključek

Naša opazovanja pri uporabi omenjenih bakterioloških in seroloških metod za diagnozo pertusisa so sorodna opažanjem nekaterih drugih avtorjev (Scottish Report, 1970), ki ugotavljajo približno 50-odstotno uspešnost proti kliničnim ugotovitvam tega obolenja. Dokazovanje specifičnih protiteles pri otrocih, starih do 6 mesecev, pa se odstotek še znižuje zaradi imunske nedozorelosti.

NAJVEČJA NAGRADA ZA ČLOVEKOV TRUD NI TISTO, KAR BO ZANJ DOBIL, TEMVEČ TISTO, KAR BO POSTAL.

Ruskin