

Министерство здравоохранения СССР
Ростовский-на-Дону Государственный
научно-исследовательский противочумный институт
Всесоюзный ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный институт
"Микроб"

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО СЕРОЛОГИЧЕСКОМУ ТИПИРОВАНИЮ ВИБРИОНОВ
НЕ АГГЛУТИНИРУЮЩИХСЯ О-ХОЛЕРНОЙ СЫВОРОТКОЙ

Саратов
1980

Министерство здравоохранения СССР
Ростовский-на-Дону Государственный
научно-исследовательский противочумный институт
Всесоюзный ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный институт
"Микро"

"УТВЕРЖДАЮ"

Заместитель начальника
Главного управления карантинных
инфекций
Министерства здравоохранения
СССР
02.04.80г. Д.М.МАРЧУК

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО СЕРОЛОГИЧЕСКОМУ ТИПИРОВАНИЮ ВИБРИОНОВ,
НЕ АКТИВИРУЮЩИХСЯ О-ХОЛЕРНОЙ СЫВОРОТКОЙ

Саратов
1980

В методических указаниях описан способ серологической дифференциации вибрионов, не агглютинирующихся колерными сыворотками (НАГ-вибрионов). Данный способ предусматривает постановку ориентировочной реакции агглютинации на стекле с polyvalentной сывороткой, объемной агглютинации со смесями типовых сывороток и определении типовой принадлежности штаммов НАГ-вибрионов путем постановки реакции агглютинации с типовыми сыворотками, входящими в состав смеси, которая дала положительную реакцию.

Испытания polyvalentной, групповых и типовых сывороток проводились в научно-исследовательских противочумных институтах ("Микроб", Ростовский-на-Дону, Кавказа и Закавказья, Иркутский), противочумных станциях (Ленинградская, Одесская, Узбекская, Туркменская, Крымская и другие), в лабораториях санэпидстанций Саратова, Николаева, Ростова-на-Дону, Запорожья. Из всех указанных научных и практических учреждений получены положительные заключения.

Способ серологической дифференциации НАГ-вибрионов может быть широко использован для диагностики и эпидемиологического анализа острых кишечных заболеваний, вызываемых НАГ-вибрионами.

Методические указания составлены А.К.Адамович, Л.Г.Воронехской, Г.Б.Гальцевой, Г.М.Медвинским, Л.М.Смоликовой, А.Г.Сомовой, Г.А.Усовым, Б.И.Шуркиной.

В В Е Д Е Н И Е

Микроорганизмы, сходные с возбудителем холеры по морфологическим, культуральным и основным биохимическим свойствам, но не агглютинирующиеся холерными сыворотками, широко распространены в природе. Установлена этиологическая роль НАГ-вибрионов в возникновении острых кишечных заболеваний у людей.

НАГ-вибрионы неоднородны по антигенной структуре. Они обладают термолabileм жгутиковым и термостабильным соматическим антигенами. Наличие различных типоспецифических компонентов в составе O-антигенного комплекса у разных штаммов НАГ-вибрионов позволяет разделить их на серологические варианты и дифференцировать НАГ-вибрионы от холерных вибрионов, которые относятся к O1 серогруппе.

В СССР создана коллекция типовых штаммов НАГ-вибрионов, включающая 38 (O2-O39) из коллекции Р.Саказаки; 5 (O40 - O44) - описанных И.И.Шуркиной и А.К.Адаловым; II - описанных А.Е.Дюбинзон, Г.В.Гальцевой, А.Г.Семсвой, Л.Г.Версинежской и др. (O45 - O55); I - O56 (В.А.Крытханов с соавт.) - всего 55 штаммов.

Антигенное родство между отдельными серогруппами (4 и 6; 2 и 9; 3, II и 20; 13 и 29; 14 и 36; 10, 16 и 24 и ряда других) учитывается при изготовлении смесей типовых O-сывороток.

Сыворотками к указанным 55 типовым штаммам агглютинируется более 70% культур НАГ-вибрионов, выделяемых от больных острыми кишечными заболеваниями и вибрионосителей НАГ-вибрионов. Наиболее часто встречаются вибрионы O5, O2, O6, O24, O34, O47, O50

и некоторых других серогрупп.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАГ-ВИБРИОНОВ

Серотипированию подлежат культуры, идентифицированные как представители рода *Vibrio*, не агглютинирующиеся холерными сыворотками. НАГ-вибрионы обладают оксидазной активностью, расщепляют глюкозу в среде Хью и Лейфсона с образованием кислоты без газа в аэробных и анаэробных условиях, декарбоксилируют лизин и орнитин, не имеют дигидролазы аргинина, расщепляют маннит, инактивны к инозиту, относятся к I или II группам Лейберга, разжижают желатину, восстанавливают нитраты в нитриты, способны образовывать индол, не продуцируют сероводород, не обладают уреазной активностью, не флюоресцируют.

В свете современных таксономических критериев микроорганизмы, сходные с вибрионами по морфологическим свойствам, но ферментирующие углеводы по типу III - VIII групп Лейберга, к НАГ-вибрионам, как правило, не относятся.

Культуры НАГ-вибрионов, отобранные для типирования, следует выращивать на питательном агаре (мясопептонном, Мартена или из перевара сердечной мышцы, pH 7,6 - 7,8) в течение 18-20 ч при 37°. В качестве антигена для реакции агглютинации на стекле используют суточные агаровые культуры, а для объемной агглютинации - взвеси в физиологическом растворе (pH - 7,2) этих культур, содержащие в 1 мл I млрд. м.к. по оптическому стандарту мутности ГИСК им. И.А.Тарасевича.

КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ О НАБОРЕ АГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК

Диагностические O-агглютинирующие типовые сыворотки против 55 серотипов НАГ-вибрионов получают иммунизацией кроликов культурами типовых штаммов НАГ-вибрионов из коллекции Саказики и обнаруженных на территории СССР.

В качестве антигена для иммунизации применяют взвеси суточных агаровых культур, убитых кипячением в течение 2 ч. Животным вводят внутривенно 1, 2, 4 млрд. м.к. в объеме одного мл с интервалами 5-6 дней, или подкожно - первая и вторая инъекция по 20 млрд. м.к., а третья - внутривенно 5 млрд. м.к. с интервалом в три дня. Если спустя 7 дней после последней инъекции в сыворотках обнаруживаются агглютинины в титрах 1:1600 - 1:3200, то кроликов оескровливают. При низких титрах делают внутривенно 2-3 дополнительные инъекции в дозе 4-5 млрд. м.к. В случае обнаружения в сыворотках групповых антител их адсорбируют формализованными микробными взвесями соответствующих штаммов в концентрации от 50 до 200 млрд. м.к. на 1 мл сыворотки, разведенной 1:5.

Сыворотки выпускают в стандартных разведениях - в 1/10 диагностического титра по отношению к вибрионам гомологичного серотипа.

Учитывая большое количество серотипов, предлагается II смесей типовых сывороток для предварительного исследования. Смесей I, II, III, VII и X используют в виде готовых препаратов, состоящих из сывороток против вибрионов трех - шести серотипов. Остальные шесть смесей (IV, V, VI, VIII, IX и XI) приготавливают непосредственно

перед употреблением, включая в их состав в равных объемах пять — шесть сывороток, указанных выше. Объем соединяемых сывороток определяют в зависимости от количества исследуемых штаммов из расчета 0,5 мл смеси на одну культуру.

В I, II, III и VIII смеси входят сыворотки к ПАГ-вирионам, которые наиболее часто встречаются на территории Советского Союза.

Кроме того, для ориентировочной агглютинации на стекле предложена диагностическая вирионная 0-агглютинирующая поливалентная сыворотка, полученная путем смешения сывороток против вирионов 38 серотипов коллекции Саказики и 40-го серотипа.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Исследуемую культуру сначала изучают в реакции агглютинации на стекле с диагностической поливалентной сывороткой. На дне чашки пестри наносят из ампулы каплю сыворотки, в которой тщательно растирают пестлей исследуемую культуру. В качестве контроля используют каплю физиологического раствора pH — 7,2. Содержимое капель смешивают покачиванием чашки. Результат учитывают через 1—2, окснчательно — через 10 мин. для предотвращения подсыхания капель чашку накрывают крышечкой. положительной считается реакция на 3—4 креста при отрицательном контроле в физиологическом растворе.

В зависимости от результата реакции с поливалентной сывороткой серологическое титрование проводят по одному из 4 вариантов.

I. Штамм, агглютинирующийся указанной сывороткой, исследуют в первую очередь с первыми тремя готовыми групповыми сме-

сями сывороток, которые агглютинируют большинство энтеропатогенных вибрионов. Каждую смесь из ампулы разводят физиологическим раствором 1:5, вносят в пробирки по 0,5 мл и добавляют равный объем антигена.

При использовании составленных смесей сывороток реакцию ставят в одной пробирке, в которую вносят 0,5 мл смеси и 0,5 мл 1 млрд. взвеси суточной агаровой культуры исследуемого штамма.

Реакции сопровождают следующими контролями:

а) контроль антигена - 0,5 мл физиологического раствора и 0,5 мл взвеси исследуемой культуры;

б) контроль сыворотки - 0,5 мл соответствующей смеси и 0,5 мл физиологического раствора.

После тщательного встряхивания все пробирки помещают на 4 ч в термостат при 37°, а затем - на 18-20 ч при комнатной температуре.

Учет результатов производят по описанной методике, считая положительной реакцию на 3-4 креста. При получении положительной реакции с одной из смесей ставят агглютинацию с типовыми сыворотками, входящими в ее состав, по той же методике, что и с готовыми смесями. Положительная реакция агглютинации с одной из типовых сывороток является основанием для отнесения исследуемой культуры к ВИ-вибрионам к соответствующему серотипу.

Культуры, не агглютинирующиеся первыми смесями сывороток, изучают со смесями IV, V, VI, VII, составленными из сывороток к редко встречающимся серотипам.

Штаммы вибрионов, которые не агглютинируются polyvalent-ной сывороткой, исследуют со смесями VIII, IX, X и XI, содержащими

сыворотки к дополнительным серотипам, часть из которых, входящих в УШ смесь, обладают выраженными энтеропатогенными свойствами и широко распространены. При получении положительной реакции описанным выше способом определяют принадлежность к соответствующему серотипу.

Из сывороток к вновь обнаруживаемым типовым штаммам могут быть оставлены смеси в дополнение к предлагаемым, а последовательность использования смесей может быть изменена в зависимости от состава серотипов НАГ-вибрионов, встречающихся на той или иной территории.

СХЕМА СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Ориентировочная агглютинация с поливалентной агглютинирующей сывороткой O ₂ - O ₄₀		
положительная	!	отрицательная
Объемная агглютинация со смесями		
I (групповая I) - 2, 5, 22, 40		УШ (составленная) - 45, 47, 50, 51, 56
II (групповая 5) - 6, 26, 34, 39		IX (составленная) - 27, 46, 43, 49, 53
III (групповая 4) - 16, 24, 37		X (групповая 2) - 13, 29, 41, 42, 43, 44
IV (составленная) - 7, 14, 15, 21, 35		XI (составленная) - 26, 52, 54, 55
У (составленная) - 17, 19, 25, 32, 36		
VI (составленная) - 3, 11, 20, 30, 31, 38		
VII (групповая 3) - 4, 8, 12, 18		

Примечания:

1. В случае получения положительного результата с поливалентной сывороткой и отрицательного - со смесями I-VII рекомендуется ставить реакцию агглютинации со смесями УШ-XI.

2. Для определения серотипа исследуемой культуры ставят реак-

цию агглютинации с титровыми сыворотками той смеси, с которой получен положительный результат.

3. При положительной агглютинации со смесью I, кроме указанных в схеме серотипов, реакцию агглютинации ставят и с сывороткой против 9-го серотипа, со смесью II - 33-го серотипа, со смесью III - 10-го серотипа, со смесью VIII - 23-го серотипа.

4. Культуры относят к ветипирующимся после получения отрицательного результата в реакции ориентировочной агглютинации с поливалентной сывороткой и смесями VIII-XI.

ХРАНЕНИЕ СЫВОРОТОК

Сыворотки в ампулах хранят в темном сухом месте при температуре 4°C , а после перенесения в пробирки с резиновыми пробками в холодильнике при той же температуре. Сыворотки, разведенные физиологическим раствором или соединенные в смеси, можно хранить в условиях холодильника не более 7-10 дней.