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 АГГЛЮТИНИРУЮЩИХСЯ О-ХОЛЕРНОЙ СЫВОРОТКОЙ

Саратов
1980

gost.e-ecolog.ru

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

"УТВЕРЖДАЮ"
Заместитель начальника
Главного управления карантинных
инфекций
Министерства здравоохранения
СССР
02.04.80г. Л.М.МАРЧУК

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

Саратов
1980

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

Испытания поливалентной, 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.Адамовичем, Л.Г.Воронежской, Г.Б.Гальцевой, Г.М.Мединским, 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 термолабильным жгутиковым и термостабильным соматическим антигенами. Наличие различных типоспецифических компонентов в составе О-антигенного комплекса у разных штаммов НАГ-вибрионов позволяет разделить их на серологические варианты и дифференцировать НАГ-вибрионы от холерных вибрионов, которые относятся к 01 серогруппе.

В СССР создана коллекция типовых штаммов НАГ-вибрионов, включающая 38 (02-039) из коллекции Р.Саказаки; 5 (040 - 044) - описанных И.Н.Шуркиной и А.К.Адамовым; 11 - описанных А.Е.Либинзон, Г.В.Гальцевой, А.Г.Семеновой, А.Г.Воронежской и др. (045 - 055); 1 - 056 (Е.А.Кригханов с соавт.) - всего 55 штаммов.

Антигенное родство между отдельными серогруппами (4 и 6; 2 и 9; 3,11 и 30; 13 и 29; 14 и 38; 10,16 и 24 и ряда других) учитывается при изготовлении смесей типовых О-сывороток.

Сыворотками к указанным 55 типовым штаммам агглютинируется более 70% культур НАГ-вибрионов, выделяемых от больных острыми кишечными заболеваниями и вибриононосителей НАГ-вибрионов. Наиболее часто встречаются вибрионы 05, 02, 06, 024, 034, 047, 050

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 Кейберга, разжижают желатину, восстанавливают нитраты в нитриты, способны образовывать индол, не продуцируют сероводород, не обладают уреазной активностью, не фосфоресцируют.

В свете современных таксономических критериев микроорганизмы, сходные с вибрионами по морфологическим свойствам, но ферментирующие углеводы по типу III - VIII групп Кейберга, 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 I мл I млрд. м.к. по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ О НАБОРЕ АГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК

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

В качестве антигена для иммунизации применяют взвеси суточных агаровых культур, уоитых кипячением в течение 2 ч. Животным вводят внутривенно I,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 I:I600 - I:3200, то кроликов обескровливают. 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 формалинизированными микробными взвесями соответствующих штаммов в концентрации от 50 до 200 млрд. м.к. на 1 мл сыворотки, разведенной I:5.

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

Учитывая большое количество серотипов, предлагается II смесей типовых сывороток для предварительного исследования. Смеси I, II, Ш, УП и X используют в виде готовых препаратов, состоящих из сывороток против вибрионов трех - шести серотипов. Остальные шесть смесей (IУ,У,УI,УШ,IX и XI) приготавливают непосредственно

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

В I,II,III и УШ смеси входят сыворотки к НАГ-вибрионам, которые наиболее часто встречаются на территории Советского Союза.

Кроме того, для ориентировочной агглютинации на стекле предложена диагностическая вибрионная О-агглютинирующая поливалентная сыворотка, полученная путем смешения сывороток против вибрионов 36 серотипов коллекции Саказаки и 40-го серотипа.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

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

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

I. Штаммы, агглютинирующиеся указанной сывороткой, исследуют в первую очередь с первыми тремя готовыми групповыми смо-

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 I 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 37^0, а затем - на 18-20 ч при комнатной температуре.

Учет результатов производят по общепринятой 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 НАГ-вибрионов к соответствующему серотипу.

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

4. Штаммы вибрионов, которые не агглютинируются поливалентной 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 составлены 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) - 27,46,48, 49,53
III (групповая 4) - 16, 24, 37	X (групповая 2) - 13,29,41,42, 43, 44
IУ (составленная)- 7,14,15,21,35	XI (составленная) - 26,52,54,55
У (составленная)- 17,19,25,32,36	
УI (составленная) - 3,11,20,30,31, 38	
УII (групповая 3) - 4,8,12,18	

Примечания:

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

2. Для определения серотипа исследуемой культуры ставят реак-

цию агглютинации с типовыми 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 нетипирующимся после получения отрицательного результата в реакции ориентировочной агглютинации с поливалентной сывороткой и смесями VII-XI.

ХРАНЕНИЕ СЫВОРОТОК

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

gost.e-ecolog.ru