

УДК 616 - 078.7 : 616.981.49

A.T. КЕНЖЕБАЕВА, Е.Т. АЙМУРЗАЕВА

# СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА САЛЬМОНЕЛЛЕЗА И ШИГЕЛЛЕЗА. КОНСТРУИРОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНОГО ДИАГНОСТИКУМОВ ДЛЯ РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

*(Научный центр гигиены и эпидемиологии им. Х. Жуматова)*

Приготовленный диагностикум сальмонеллезной и шигеллезной специфичности был использован для постановки реакции непрямой гемагглютинации с сыворотками здоровых сельских жителей и больных с различными диагнозами. Рекомендуемый минимальный диагностический титр составил 1:80.

Серологические методы, в том числе реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), получили широкое распространение при диагностике инфекционных заболеваний благодаря высокой чувствительности, экспрессивности и простоте постановки. РНГА при острых кишечных инфекциях имеет высокую диагностическую ценность для выявления антител к шигеллам и сальмонеллам.

Нами при приготовлении сальмонеллезных антигенных ЭД использованы музейные штаммы, полученные из ГИСК им. Тарасевича: групп А, В, С1, С2, Д, Е.

Идентификацию штаммов проводили в соответствии с руководством под редакцией В.И. Покровского [1], изучали культурально-морфологические и ферментативные свойства, включая тесты на глюкозу, рамнозу, лактозу, сахарозу, дульцит, рафинозу, малтозу, манит, ксилозу, инозит, сорбит, Д-тарtrат, цитрат Симонса, ацетат Na; определяли подвижность, образование газа H<sub>2</sub>S, индола; утилизацию малоната Na, тест с фенилаланином, поведение на среде Кларка, расщепление аминокислот (лизин, орнитин, аргинин).

Серологические свойства штаммов изучали в реакции агглютинации (РА) с коммерческими адсорбированными агглютинирующими сыворотками к О- и Н-антigenам (производства Санкт-Петербургского НИИ вакцин и сывороток РАО "Биопрепарат", серия 11-0901, 5-1201, 42-0702, С. 12.).

Коммерческие неадсорбированные иммунные сыворотки против *S. paratyphi A* (гр. А), *S. paratyphi B*, *S. typhimurium*, *S. heidelberg* (гр. В), *S. choleraesuis* (гр С1), *S. newport* (гр. С2),

*S. enteritidis*, *S. typhi* (гр. Д), а также *S. sonnei*, *S. flexneri*.

Исследованы 382 сыворотки крови, поступавшие ежемесячно от доноров Алматинской области (в том числе по Карасайскому району) и лихорадящих больных с не установленной этиологией по г. Алматы.

Первым этапом получения групповых антигенных эритроцитарных диагностикумов (ЭД) явилось накопление микробной массы.

Выращенные микроорганизмы смывали стерильным физиологическим раствором. После фильтрования бактериальные клетки обрабатывали охлажденным ацетоном. Надосадок сливали и дважды микробную массу отмывали охлажденным ацетоном и выдерживали в течение 18-20 часов при температуре 3-4°C. Затем центрифугировали и полученную микробную массу высушивали.

Липополисахариды (ЛПС)-антигены получали по методу Вестфала из сухой микробной массы сальмонелл - *S. paratyphi A* (гр. А), *S. typhimurium*, (гр. В), *S. choleraesuis* (гр С1), *S. tshiongwe* (гр. С2), *S. enteritidis* (гр. Д), *S. anatum* (гр. Е), а также *S. sonnei*, *S. flexneri*. После 3-дневного диализа против водопроводной воды препараты лиофилизировали.

При изготовлении антигенных ЭД использовали эритроциты барана, формализованные по методу Вайнбаха. Сенсибилизацию формалинизованных эритроцитов антигеном без посредников проводили по модифицированному методу Соколова-Кравченко [2]. Смешивали равные объемы 10% формалинизованных эритроцитов барана и раствора сенситина при pH 7,2. Смесь

выдерживали в течение 1,5 часов в термобане при 45оС, периодически встряхивая. Затем сенсибилизованные эритроциты трижды отмывали 0,85% физраствором, содержащим 0,02% бычьего сывороточного альбумина рН 7,2 ресуспенсировали до первоначального объема

В течение года приготовлено 5 серий каждого из групповых антигенных (АГ-ЭД). Для каждого приготовленного диагностикума определяли оптимальную дозу сенситина в мкг/мл [3]. Наиболее высокие титры в РПГА у всех групповых ЭД отмечены при дозе сенситина 125- 500 мкг/мл.

РПГА ставили микрометодом в полистироловых планшетах. Для постановки развернутой РПГА готовили последовательные разведения сыворотки в объеме 50 мкл, в которые вносили 25 мкл 0,5% взвеси антигенного ЭД.

Чувствительность диагностикума оценивали по титрам РПГА с гомологичными сыворотками.

Опыт повторяли 4-кратно. Активность иммунных сывороток в РНГА с гомологичными диагностикумами была в 20-25 раза выше, чем с ЭД других групп сальмонелл. При проведении серомониторинга использованы только те партии ЭД, при которых титры контрольных иммунных сывороток в РНГА были не ниже 1:5120.

Специфичность приготовленных ЭД каждой из сальмонеллезных групп изучали с использованием гетерологичных сывороток *S. flexneri* и *S. sonnei* с целью оценки влияния перекрестных детерминант. Ig-tитров сывороток против *S. flexneri* и *S. sonnei* были низкими - 3,4-6,3.

Стабильность приготовленных ЭД, консервированных 0,05% азидом натрия, оценивали при хранении в жидком виде при температуре 3-5оС. Проверку проводили через 1, 7 дней, 1, 2, 3, 6 месяцев. Установлено, что приготовленные диагностикумы сохраняли чувствительность и специфичность в течение 6 месяцев.

При приготовлении антигенных ЭД использованы штаммы сальмонелл *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, выделенные от больных сальмонеллезом в г. Алматы и, обладавшие типичной антигенной формулой и культурально-биохимическими свойствами [4]. Высота титров гомологичных сывороток в РНГА с ЭД составляла не менее 5120 при 5-кратной повторной постановке.

Одной из задач наших исследований явилось получение антигенных диагностических препаратов *S. flexneri* 2а и *S. sonnei*. Метод получения антигена включал следующие этапы: выросшую на питательной среде культуру музейных штаммов *S. flexneri* 170 - 2а и *S. sonnei* 11198 смывали стерильным раствором натрия хлорида. Полученную взвесь обрабатывали охлажденным этиловым спиртом и ацетоном в соотношении 1:2. Смесь выдерживали в течение 18-20 часов при температуре 4оС, затем центрифугировали в течение 45 минут при 5000 оборотов в минуту. Надосадок сливали, а осадок дважды отмывали охлажденным ацетоном при 5000 оборотов в минуту в течение 30 минут и в дальнейшем высушивали в эксикаторе.

В качестве сенситина использовали антигены *S. flexneri* 2а и *S. sonnei*, полученные в лаборатории.

Сенсибилизацию эритроцитов барана, формализованных по Вайнбах проводили при помощи танина. Сенсибилизованные эритроциты проверяли в РНГА с гомологичными и гетерологичными сыворотками.

В качестве стабилизатора использовали 0,033% раствор бычьего сывороточного альбумина.

Оптимальная доза при сенсибилизации с помощью танина составила для *S. sonnei* - 1000 мкг/мл, для *S. flexneri* - 500 мкг/мл.

Чувствительность антигенных ЭД была для *S. flexneri* 10240, для *S. sonnei* - 10240-20480.

Специфичность полученных эритроцитарных диагностикумов изучали в перекрестной РПГА с гетерологичными сыворотками. Так, антигенный ЭД *S. sonnei* реагировал с *S. flexneri* в разведении 1:160, а с *E. coli* - 1 : 40.

Антигенный ЭД *S. flexneri* давал перекрестную реакцию с *S. sonnei* в разведении 1:80, с *E. coli* - 1:80.

В работе нами предпринята попытка оценить степень эффективности применения приготовленных АГ-ЭД при изучении серогрупповой структуры и динамики циркулирующих сальмонелл и шигелл среди здоровой части населения сельской местности Алматинской области и в г. Алматы.

Изучена частота обнаружения сывороточных антител и их уровень у 1380 здоровых лиц и 315

лихорадящих больных с не установленной этиологией в возрасте 16-60 лет.

Спорным вопросом при трактовке результатов серологических исследований с помощью РНГА при однократном исследовании здорового населения является выбор величины условно-диагностического титра, который по данным авторов колебался в широких пределах от 1:2 до 1:320. В наших исследованиях за условно-диагностический титр антител к сальмонеллам в РПГА у взрослых была принята величина 1:80, групповая специфичность учитывалась при 2-кратном повышении титров антител в испытуемых сыворотках крови.

Полученные данные показали, что, начиная с марта и по сентябрь, происходило нарастание титров антител к сальмонеллам группы Д, как у лихорадящих больных с не установленной этиологией с 5 до 10,5% (с высотой титров антител от 80 до 640), так и у здоровой части сельского населения - с 7,7 до 16,5% (высота титров от 80 до 1280). В октябре месяце как у городских, так и сельских жителей наблюдали снижение в сыворотках крови высоты титров в РПГА и процента серопозитивных лиц к сальмонеллам группы Д. При этом выявляли нарастание серопозитивных лиц к сальмонеллам группы В. Серопозитивность населения к сальмонеллам групп А, С1, С2 и Е колебалась в пределах 2,3-5% и преимущественно проявлялась в летний период.

Антитела к *S.flexneri* в титре 1:80 в сыворотках крови доноров выявлены у 8,4%, в титре 1:160 - у 1,5% и в титре 1:320 - у 0,6% обследованных. Серопозитивными к *S. sonne* оказалось 13,8% обследованных лиц. При этом антитела к *S. sonne* в титре 1:80 обнаружены у 11,8%, в титре 1:160 - у 2,0% обследованных.

Таким образом, исследования показали, что при одинаковом способе получения ЛПС-антисыворотки из штаммов паратифа А, тифимуриум, холерасус, шонгве, энтеритидис и анатум изготовлены специфичные и чувствительные антигенные ЭД. Высота титров сывороток против паратифа

А, паратифа В и брюшнотифозной сыворотки с гомологичными диагностиками была сравнительно высокой.

Проведен серомониторинг среди городских и сельских жителей по ведущим кишечным инфекциям с применением ЭД лабораторного изготовления.

Предложен способ оценки полученных результатов при однократном исследовании здорового "фонового" населения с учетом условно-диагностического титра 1:80 с одновременной внутригрупповой дифференциацией при 2-кратном повышении титра испытуемых сывороток.

Оценка чувствительности и специфичности ЛПС-антисывороток ЭД, приготовленные из местных штаммов *S. typhimurium* *S. enteritidis*, не уступали ЭД, полученным из музейных штаммов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Покровский В.И., Поздеев О.К. Медицинская микробиология. М.: Медицина, 1998. 1182 с.
2. Каульник Б.В. Шамардин В.А. //Сенсибилизация эритроцитов препаратами иммуноглобулинов. Метод. рекомендации. Алматы, 1981. 12 с.
3. Каульник Б.В., Денисова Т.Г. //Иммунодиагностика сальмонеллеза тифимуриум. Метод. рекомендации. Алматы, 1994. 10 с.
4. Кенжебаева А.Т., Уразов В.К., Тулепбаева С.Д. и др.. Выделение возбудителей сальмонеллезов от людей и из объектов внешней среды г.Алматы. // Гигиена, эпидемиол. и иммунобиол. 2001. №1-2. С.94-97.

## Резюме

Дайындалған сальмонеллездің және шигеллездің арнайылығы бар диагностикумы сау ауыл тұрғындары мен диагнозы өртүрлі науқас тұрғындарға тұра емес геммаглютинация реакциясын қоюға қолданылады.

Ұсынылған ең тәменгі диагностикалық титр 1:80 құрады.

## Summary

The preparations were used for the titration of blood sera obtained from the village healthy persons and patients with different diagnosis.

The titer 1: 80 in the passive haemagglutination (PHA) test is recommended as the minimal diagnostic indicator.