

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВООЧУМНЫЙ  
ИНСТИТУТ "МИКРОБ"

РГБ  
23 ноя 1998

На правах рукописи

Сомова Галла Анатольевна

**АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА И СЕРОТИПИРОВАНИЕ НОВЫХ  
ШТАММОВ НЕАГГЛЮТИНИРУЮЩИХСЯ ВИБРИОНОВ**

03.00.07 — микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Саратов — 1998

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении "Российском научно-исследовательском противочумном институте "Микроб" МЗ РФ

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, с.н.с. Елисеев Ю.Ю.

**Официальные оппоненты:**

Заслуженный деятель наук Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор Л.В.Самойлова,

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Г.М.Сергеева

**Ведущая организация:**

Ростовский научно-исследовательский противочумный институт

Защита состоится «17» декабря 1998 г. в 10<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 074.32.01 Российского научно-исследовательского противочумного института "Микроб" по адресу 410005, г.Саратов, ул. Университетская, 46.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке института "Микроб".

Автореферат разослан «16» декабря 1998 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор биологических наук, профессор

Г.А.Корнеев

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Диарейные заболевания, вызываемые энтеропатогенными вибрионами относятся к одной из проблем, затрагивающих интересы всех стран. Эпидемические вспышки и спорадические заболевания, вызываемые этими вибрионами, регистрируются во многих странах мира: Индии, Судане, Восточном Пакистане, СНГ, Чехословакии, Болгарии, Венгрии, Мексике, США, - Бразилии и других (Воронежская Л.Г. с соавт., 1986; Ломов Ю.М. с соавт., 1992; Марамович А.С. с соавт., 1992; Онищенко Г.Г с соавт., 1994; Вік Е.М. et al., 1995).

По официальным данным ВОЗ с 1 января по 30 декабря 1993 года, общее число заболеваний холерой в мире все еще превышало показатели за прошедшие 30 лет. Отличительной чертой последнего времени явилось распространение во многих странах нового энтеропатогенного серовара *V.cholerae*, отличающегося от известных до сих пор 138 сероваров; в настоящее время он обозначен как *V.cholerae* 0139. Отсутствие иммунитета к новому эпидемическому штамму, а также диагностических препаратов для его своевременного обнаружения создает реальную угрозу дальнейшего распространения вызываемых им заболеваний. Последнее обстоятельство открывает новую страницу в более, чем столетней истории холерных вибрионов не 01 группы со времени их обнаружения и повышает актуальность этой проблемы. Тенденция к распространению нового вибриона вызвала опасение, что он может заменить *V.Cholerae* эльтор таким же образом, как с середины 60-х годов последний заменил классический биовар *V.cholerae* (Воронежская Л.Г. 1994; Altman L.K. 1993; Jesudason M.V. et al. 1993; Swerdiow D.L. 1993).

Если вызвавший 7 пандемию штамм холерного вибриона 01 распространился с о.Целебес в Индонезии через Бангкок в Индию в течение трех лет, то штамм 0139 распространяется быстрее.

Появление нового возбудителя эпидемий холеры изменяет представление об эпидемиологии, поскольку новый штамм вызывает не

отличимое от холеры заболевание и обладает сходным эпидемическим потенциалом.

Холерные вибрионы не 01 группы широко распространены на территории России и СНГ (Адамов А.К. с соавт., 1974; Андросова-С.В. с соавт., 1989; Тепляков А.Б. 1991; Щуркина И.И. с соавт., 1991).

Ежегодно их выделяли из объектов окружающей среды в различных климатогеографических зонах страны, но наиболее часто в южных регионах. *Vibrio cholerae* non 01 представляют интерес для исследователей, с одной стороны, как постоянные обитатели различных водоемов, с другой - как возможный показатель циркуляции при некоторых условиях и в определенный период холерных вибрионов 01 группы.

Установление серологического O-варианта у неагглютинирующихся вибрионов имеет важное значение для расшифровки связей в микроочагах вызываемых ими заболеваний.

Единых критериев для идентификации холерных вибрионов не 01 группы на сегодняшний день не разработано, и проблема таксономии обширной группы указанных микроорганизмов, не агглютинирующихся холерной O-сывороткой, в настоящее время далека от своего решения (Адамов А.К. с соавт., 1973; Адамов А.К. с соавт., 1984; Пилипенко В.И. с соавт., 1996).

В результате длительных исследований было установлено, что энтеропатогенные вибрионы не агглютинирующиеся холерной O-сывороткой, могут быть идентифицированы с помощью специфических вибрионных O-агглютинирующих сывороток (Киятханов Б.А. с соавт., 1975; Люкьянова О.И. с соавт., 1987; Казакова Е.С. 1990; Щуркина И.И. с соавт., 1991; Shimada T et al., 1982).

К началу проводимых исследований в нашей стране было обнаружено 79 серологических вариантов энтеропатогенных вибрионов.

Использование в практике новых монорецепторных сывороток позволяет расширить лабораторную диагностику кишечных заболеваний, вызываемых энтеропатогенными вибрионами.

С помощью имеющегося набора сывороток типифицируется до 80 % штаммов вибрионов, выделяемых от больных диареей людей (Воронежская Л.Г. с соавт., 1985; Иванов Л.В. с соавт., 1988; Тепляков А.Б. 1988).

**Цель работы.** Выделение новых серовариантов энтеропатогенных вибрионов, изучение их свойств, антигенной структуры, разработка и получение моноварных сывороток для их идентификации.

**Задачи исследования:**

1. Выделить ранее неизвестные серовары неагглютинирующихся вибрионов от больных диареей людей и из источников окружающей среды.

2. Изучить морфологические и биохимические свойства нетипирующихся имеющимися моноварными сыворотками вибрионов не 01 группы.

3. Изучить термостабильные и термолабильные антигены энтеропатогенных вибрионов новых сероваров.

4. Разработать методы получения моноклональных сывороток против вибрионов новых сероваров.

5. Изучить токсинообразование у штаммов новых сероваров с помощью дот-иммуноанализа и метода ПЦР.

**Научная новизна.** Выделены от больных диареей людей четыре штамма *V. cholerae* non 01 группы ранее неизвестных сероваров.

Впервые получены данные об антигенном строении энтеропатогенных вибрионов новых 076, 078, 082, 083 сероваров.

Впервые разработаны методики приготовления и получены моноспецифические диагностические О-агглютинирующие сыворотки для серологической идентификации энтеропатогенных вибрионов новых сероваров.

**Практическая значимость работы.**

1. Моноспецифические диагностические О-агглютинирующие сыворотки новых сероваров расширили возможности серологической идентификации вибрионов, неагглютинирующихся О-холерной сывороткой.

2. Типовые штаммы вибрионов 076, 078, 082, 083 сероваров депонированы в музее живых культур РНИПЧИ "Микроб" под номерами КМ-46 (2128), КМ-48 (1267), КМ-52 (2), КМ-54 (864).

3. Экспериментальные серии диагностических моноспецифических О-агглютинирующих сывороток против вибрионов новых 076, 078, 082 и 083 сероваров прошли апробацию в лаборатории стандартизации и контроля препаратов особо опасных инфекций ГИСК

им. Л. А. Тарасевича и в лаборатории биологического контроля РНИПЧИ «Микроб».

4. Штаммы энтеропатогенных вибрионов КМ-46 (2128), КМ-48 (1267), КМ-52 (2), КМ-54 (864), используемые для приготовления моноварных диагностических О-агглютинирующих сывороток, зарегистрированы в качестве изобретений в Государственном Комитете России по делам изобретений и открытий (№ 4715422/13; № 4715377/13; № 4856625/13; № 4838851/13).

5. Составлен и утвержден регламент производства "Сыворотки холерные не 01 группы поливалентная, групповые и моноварные кроличьи жидкис для РА"РП №541-95 от 10.11.1995.

6. Составлена и утверждена фармакопейная статья на производство диагностических сывороток 42/Д-052 ВС-95 от 01.12.1995.

**Апробация.** Материалы исследований были доложены на научных конференциях в институте "Микроб" в 1991, 1995 г, на съезде микробиологов и паразитологов - Нижний Новгород в 1991 г, на научно-практических конференциях в г.Новороссийске 1991 и 1994 гг., на научной конференции в г. Иркутске 1994 г, на Всероссийской научно-практической конференции 31 окт. 1994 г. в г.Махачкала, на научной конференции в г. Астрахани 1996 г.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 8 научных статей.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Доказательство существования новых ранее неизвестных сероваров вибрионов неагглютинирующихся холерной О-сывороткой.

2. Новые данные об антигенном строении изучаемых неагглютинирующихся вибрионов.

3. Технология получения монорецепторных диагностических вибрионных О-агглютинирующих сывороток к 076, 078, 082 и 083 сероварам.

**Объем и структура диссертации.** Работа содержит 158 страниц печатного текста, иллюстрирована 21 таблицами, 7 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов и библиографического указателя, включающего 426 источников, из них 244 работы отечественных и 182 зарубежных авторов.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследований.** Для решения поставленных задач было идентифицировано 304 штамма энтеропатогенных вибрионов, полученных от больных диареей людей и из источников окружающей среды на территории нашей страны и государств СНГ. Свойства выделенных вибрионов новых 076, 078, 082 и 083 сероваров изучали с помощью набора моносывороток против 78 типовых штаммов 02 - 075, 077, 079 - 081 сероваров, в том числе штаммы полученные от доктора Р.Саказки со 02 - 039.

Для исследований использовали стандартные питательные среды производства института "Микроб": агар из настоя сердечной мышцы рН 7,6; 1 % пептонную воду рН 7,6; бульоны Хоттингера и Мартена рН 7,4.

Исследования проводили с помощью микробиологических, биохимических, биологических, иммунологических, генетических, электронно-микроскопических и статистических методов.

Биохимические свойства исследуемых культур определяли согласно "Инструктивно-методическим указаниям по лабораторной диагностике холеры" (1984) и по методам, предложенным А.К.Адамовым, М.С.Наумшиной (1984).

Фаголизательные свойства вибрионов новых сероваров изучали с помощью холерных фагов С, эльтор, ХДФ 3, 4, 5 и набора монофагов ТЭПВ 1 - 7.

Антигенную структуру вибрионов исследовали с помощью перекрестных реакций агглютинации, метода иммуносорбции по Кастеллани и в модификации И.И.Щуркиной (1981).

Препараты О-антигенов готовили путем 2-х часового кипячения вибрионов, ОН-антигенов - добавления 2 % формалина.

Иммунные сыворотки получали методом 3-х кратной иммунизации кроликов породы шиншилла весом 2 - 2,5 кг О- или ОН-антигенами.

Токсинообразование вибрионов 076, 078, 082 и 083 сероваров определяли с помощью дот-иммуноанализа (ДИА) и метода ПЦР.

Электронно-микроскопические исследования проводили в электронном микроскопе JEM-7A.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием метода И.П.Ашмарина, А.А.Воробьева (1962).

### **Полученные результаты и их обсуждение.**

При серотипировании нами 304 штаммов выделенных от больных диареей людей, а также из объектов окружающей среды с помощью набора диагностических О-агглютинирующих сывороток против 02 - 075, 077, 079 - 081 сероваров, были обнаружены 4 новых штамма 2128, 1267, 2 и 864 которые не агглютинировались комплектом сывороток против известных сероваров энтеропатогенных вибрионов.

В дальнейшем были изучены морфологические, культуральные, физиологические, электронно-микроскопические свойства нетипирующихся штаммов вибрионов. Результаты исследований показали, что вибрионы штаммов 2128, 1267, 2 и 864 обладают совокупностью признаков, типичных для представителей рода *Vibrio*.

Термостабильные антигены и их свойства изучали в реакции агглютинации О-сывороток, полученных против вибрионов штаммов 2128, 1267, 2, 864 с типовыми штаммами 02 - 075, 077, 079 - 081 сероваров. О-сыворотки получали путем иммунизации животных клетками изучаемых вибрионов, убитых 2-х часовым кипячением.

В сыворотках против вибрионов 2128 выявлены антитела к антигенам 26, 27 сероваров. Наиболее высокие титры антител установлены против антигенов 07, 033 и 035 сероваров (1:400 - 1:3200) (табл. I).

Адсорбция О-сыворотки клетками вибрионов 033 серовара (100 млрд.м.т.) убитыми 2 % формалином извлекла гетерологичные антитела полностью. Титр антител к гомологичному штамму был 1:400. Таким образом, сыворотка обладала строгой специфичностью. Исследованная иммунная сыворотка против вибрионов штамма 2128 имела в своей структуре не менее 2-х термостабильных антигенов. Один из которых строго специфичный для штамма 2128, второй общий с антигенами 07, 033 и 035 сероваров. Его детерминанты отличались по иммунологическим свойствам от детерминант термостабильных антигенов других сероваров, энтеропатогенных вибрионов, что позволило выделить вибрионы штамма 2128 в самостоятельный серовар, которому Государственным Комитетом по



Таблица 1.

ГОМОЛОГИЧНЫЕ И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ АНТИТЕЛА В СЫВОРОТКАХ ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ О-АНТИГЕНОМ ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* NON-01 2128 076 СЕРОВАРА

Сыворотки		Серовары вибрионов, агглютинирующихся при различных разведениях сывороток				
Тип	Номер	1:10	1:80	1:100,1:200	1:400-1:3200	1:6400,1:12800
О	250	02,06,07,08,09,	02,07,011,014,	07,011,017,	07,033,035,	076
	251	011,014,017,019,	017,019,020,023,	019,023,026,	076	
	252	020,022,023,025,	025,026,029,031,	029,031,033,		
		026,029,031,033,	033,035,036,037,	035,036,039,		
		035,036,037,039,	039,054,060,061,	054,060,061,		
		040,054,060,061,	064,069,076	076		
		064,069,076				

Таблица 2.

ГОМОЛОГИЧНЫЕ И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ АНТИТЕЛА В СЫВОРОТКАХ ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ О-АНТИГЕНОМ ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* NON-01 1267 078 СЕРОВАРА

Сыворотки		Серовары вибрионов, агглютинирующиеся при различных разведениях сывороток				
Тип	Номер	1:10	1:80	1:100,1:200	1:400-1:3200	1:6400,1:12800
О	255	06,07,017,025,	06,07,017,025,	035,078	078	078
	256	030,034,043,044,	030,043,044,050,			
	257	045,046,047,048,	053,054,055,066,			
		050,051,053,054,	067,069,078			
		055,063,064,065,				
		066,067,068,069,				
		070,071,072,073,				
		074,075,076,077,				
078						

Таблица 3.

**ГОМОЛОГИЧНЫЕ И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ АНТИТЕЛА В СЫВОРОТКАХ ЖИВОТНЫХ,  
ИММУНИЗИРОВАННЫХ О-АНТИГЕНОМ ШТАММА VIBRIO CHOLERAЕ NON-01 2 082 СЕРОВАРА**

Сыворотки		Серовары вибрионов, агглютинирующиеся при различных разведениях сывороток				
Тип	Номера	1:10	1:80	1:100,1:200	1:400-1:3200	1:6400,1:12800
O	216	02,07,09,011,	02,07,09,011,	02,07,09,011,	033,082	082
	283	014,017,026,027,	017,026,027,030,	026,027,033,036,		
	4450	030,031,033,036,	031,033,036,039,	040,041,050,055,		
		039,040,041,048,	040,041,048,049,	076,078,079,081,		
		049,050,052,054,	050,054,055,076,	082		
		055,059,061,076,	077,078,079,081,			
		077,078,079,081,	082			
		082				

Таблица 4.

**ГОМОЛОГИЧНЫЕ И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ АНТИТЕЛА В СЫВОРОТКАХ ЖИВОТНЫХ,  
ИММУНИЗИРОВАННЫХ О-АНТИГЕНОМ ШТАММА VIBRIO CHOLERAЕ NON-01 864 083 СЕРОВАРА**

Сыворотки		Серовары вибрионов, агглютинирующиеся при различных разведениях сывороток				
Тип	Номера	1:10	1:80	1:100,1:200	1:400-1:3200	1:6400,1:12800
O	277	02,03,04,06,07,08,	02,03,04,07,	03,04,07,	04,07,033,	083
	4451	09,011,017,-18,019,	08,011,017,026,	08,011,026,	083	
	4452	026,029,030,031,032,	027,029,030,031,	029,033,055,		
		033,035,038,039,040,	032,033,048,055,	061,068,083		
		048,049,051,052,054,	057,059,061,063,			
		055,057,059,061,063,	068,069,070,083			
		068,069,070,073,083				

делам изобретений и открытий был присвоен номер 076.

Изучение термостабильных антигенов штамма 1267 посредством реакции агглютинации позволило выявить в них антигенные детерминанты общие с антигенами вибрионов 21 - 28 сероваров. Наличие низких титров антител против антигенов гетерологичных сероваров (1:10 - 1:80) позволило сделать вывод о том, что клеточная стенка вибрионов штамма 1267 содержит слабые термостабильные антигены, родственные антигенам гетерологичных сероваров (табл. 2).

Антиген 035 серовара вызывал образование антител в сыворотках изучаемого серовара, титр которых составлял 1:100. В диагностическом титре (1:400) сыворотки нового серовара были моноспецифические и поэтому адсорбция не проводилась. Анализ антигенной структуры энтеропатогенных вибрионов штамма 1267, позволил выделить их в самостоятельный серовар, которому Государственным Комитетом по делам изобретений и открытий присвоен номер 078. Диагностическим титром моноварной сыворотки 078 серовара следует считать разведение 1:400.

При изучении термостабильных O-антигенов энтеропатогенных вибрионов штамма 2 с помощью реакции агглютинации выявлено наличие в клеточной стенке вибрионов этого штамма присутствие около 29 антигенных детерминант. Наиболее высокий титр антител установлен против антигена 033 серовара (1:800 - 1:1600) (табл. 3). После адсорбции клетками вибрионов 033 серовара, гетерологичные антитела были извлечены полностью. Изучение антигенной структуры энтеропатогенных вибрионов штамма 2, позволило выделить их в самостоятельный серовар, которому Государственным Комитетом по делам изобретений и открытий присвоен номер 082. Диагностическим титром моноварной сыворотки 082 серовара следует считать разведение 1:400.

Термостабильные антигены вибрионов штамма 864 изучали также с помощью реакции агглютинации и иммунсорбции. Были обнаружены антигенные детерминанты, общие с антигенными детерминантами 36 известных сероваров (табл. 4). После адсорбции O-сыворотки OН-антигенами 033 серовара гетерологичные антитела были извлечены полностью. Полученная сыворотка содержала антитела только против штамма 864, что позволило сделать вывод

о наличии в структуре этого штамма термостабильного антигена, отличающегося по своим свойствам от термостабильных антигенов других сероваров.

Таким образом, в клетках вибрионов штамма 864 содержится серовароспецифический термостабильный антиген иммунологически отличающийся от О-антигена вибрионов известных сероваров, а также небольшое количество термостабильных антигенов, которые являлись общими с антигеном 033 серовара. На основании полученных данных вибрионы штамма 864 выделены в самостоятельный серовар, которому Государственным Комитетом по делам изобретений и открытий был присвоен номер 083. Диагностическим титром моноварной сыворотки 083 серовара следует считать разведение 1:400.

Для изучения термолабильных антигенов вибрионов новых 076, 078, 082 и 083 сероваров нами были приготовлены против них Н-агглютинирующие сыворотки. Они готовились из ОН-сывороток, полученных от кроликов, иммунизированных взвесью вибрионов, убитых 2 % формалином. ОН-сыворотка адсорбировалась клетками термостабильного антигена гомологичного штамма убитыми кипячением при температуре 100° С в течение 2-х часов.

Н-сыворотка против термолабильных антигенов 076 серовара, агглютинировала живые клетки гомологичного штамма в разведении 1:160. При исследовании Н-сыворотки против вибрионов 076 серовара в реакции агглютинации с вибрионами 02 - 075, 077, 079 - 081 сероваров было выявлено, что в ней содержались антитела против вибрионов 017, 026, 050, 061, 062 и 076 сероваров.

Для адсорбции термолабильных антигенов против вибрионов 050 и 061 сероваров были приготовлены ОН-антигены этих штаммов. Путем адсорбции Н-сыворотки клетками вибрионов 05 серовара удалось извлечь антитела против антигенов 017, 026 и 050 сероваров. После адсорбции клетками вибрионов 061 серовара были извлечены антитела к вибрионам 061 и 062 сероваров. Адсорбция смесью антигенов 050 и 061 сероваров привела к получению Н-сыворотки содержащей антитела только против штамма 2128.

Из приведенных данных следует, что в клетках вибрионов штамма 2128, являющегося новым 076 сероваром энтеропатогенных вибрионов содержались один строго специфичный для этого серовара

и не менее трех преобладающих, но различных по специфичности термолабильных антигенов.

Н-сыворотка против термолабильных антигенов вибрионов 078 серовара содержала антитела к вибрионам гомологичного штамма 1267 и к вибрионам 09, 025, 031, 034, 035, 055, 060, 061, 064 сероваров. После адсорбции Н-сыворотки клетками вибрионов 055 серовара из нее извлеклись антитела к термолабильным антигенам 025, 031, 034, 035 и 055 сероваров, после адсорбции клетками вибрионов 064 серовара - антитела против термолабильных антигенов 09, 025, 034, 060, 061 и 064 сероваров; после адсорбции смесью клеток вибрионов 055 и 064 сероваров в Н-сыворотке сохранились специфические антитела против термолабильного антигена 078 серовара.

Таким образом, в клетках вибрионов штамма 1267, являющегося новым 078 сероваром энтеропатогенных вибрионов содержались один строго специфичный для этого серовара и не менее 3-х различных по специфичности термолабильных антигенов.

В Н-сыворотке против вибрионов 082 серовара, кроме антител к вибрионам гомологичного штамма содержались антитела к вибрионам 02, 03, 011, 026, 030, 033, 040, 049, 055, 077, 078 и 081 сероваров. После адсорбции Н-сыворотки клетками вибрионов 03 серовара, из нее были извлечены антитела против антигенов 03, 011, 026, 033, 040, 055 и 081 сероваров. После второй адсорбции Н-сыворотки клетками вибрионов 049 серовара, из сыворотки были извлечены антитела против антигенов 026, 030, 049, 055, 077 и 081 сероваров. Третья адсорбция была проведена клетками вибрионов 078 серовара, из сыворотки были извлечены антитела против 02, 026, 030, 040, 055, 077, 078 и 081 сероваров. Адсорбция смесью клеток вибрионов 03, 049, 078 сероваров позволила извлечь антитела гетерологичных вибрионов и получить Н-сыворотку содержащую только специфические антитела против термолабильного антигена 082 серовара.

Таким образом, в клетках вибрионов штамма 2 являющегося новым 082 сероваром энтеропатогенных вибрионов содержалось не менее четырех различных по специфичности термолабильных антигенов, в том числе один строго специфичный для этого серовара.

В Н-сыворотке к штамму 864 083 серовара полученной по той же схеме также содержались антитела к другим сероварам. При проведении реакции иммунсорбции гетерологичных антител клетка-

ми вибрионов тех сероваров, которые агглютинировались Н-сывороткой, определилась специфичность термолабильных антигенов вибрионов штамма 864. После проведения адсорбции Н-сыворотки клетками вибрионов 050 серовара, из нее были извлечены антитела к антигенам 011, 025, 028, 031, 033, 034, 036, 055, 057, 059, 068, 077, 081 сероваров. При адсорбции Н-сыворотки клетками вибрионов 078 серовара, из нее были извлечены антитела к антигенам 09, 025, 028, 030, 059, 061, 068, 078 и 081 сероваров. После адсорбции Н-сыворотки клетками вибрионов 050 серовара, из нее были извлечены антитела к антигенам 011, 034, 036, 050, 055, 059, 068, 073, 081 сероваров. Адсорбция смесью клеток вибрионов 055, 033 и 078 сероваров дала возможность полностью извлечь антитела гетерологичных вибрионов и получить Н-сыворотку против термолабильного антигена 083 серовара.

Из приведенных данных можно сделать вывод, что в клетках вибрионов штамма 864, являющегося новым 083 сероваром энтеропатогенных вибрионов содержалось не менее четырех различных по специфичности термолабильных антигенов, в том числе один строго специфичный для данного серовара.

При проведении дот-иммуноанализа у штаммов 2128, 1267, 2, 864 было обнаружено наличие холероподобного токсина в разных соотношениях; в среде культивирования (свободный), на наружных мембранах (связанный) и в лизатах клеточных взвесей (внутриклеточный).

В дот-иммуноанализе была установлена способность изучаемых штаммов продуцировать экзотоксин, эпитопы которого гомологичны моноклональным антителам к В субъединице холерного токсина.

При исследовании с помощью метода ПЦР было установлено, что все четыре штамма не содержали нуклеотидной последовательности характерной для участка *ctx A* гена *V.cholerae* ( $Tox^+$ ).

Изучаемые штаммы продуцировали токсин отличающийся от холерного токсина, так как в методе ПЦР к А субъединичному комплексу результат был отрицательный, в то время как в реакции дот-иммуноанализа к В субъединичному комплексу результат был положительный.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что изучаемые штам-

мы продуцировали токсины отличающийся от холерного, но вызывающий энтеропатогенные заболевания у людей.

Проведенные исследования антигенной структуры энтеропатогенных вибрионов новых сероваров дали возможность для разработки методик получения вибрионных О-агглютинирующих сывороток против 076, 078, 082 и 083 сероваров.

Новые диагностические сыворотки были применены в комплексе с экспериментально- производственными сыворотками (выпущенными институтом "Микроб") при идентификации 304 штаммов энтеропатогенных вибрионов. Частота обнаружения штаммов 076 серовара составляла 2,96 %; 078 серовара - 0,65 %; 082 серовара - 2,96 %; 083 серовара - 3,94 %.

Следовательно, в результате произведенных исследований обнаружены 4 новых серовара энтеропатогенных вибрионов, зарегистрированных в качестве изобретений (А.С. № 1632033, А.С. № 1668390, А.С. № 1733468, А.С. № 1726510).

Разработаны методики приготовления моноварных диагностических О-агглютинирующих сывороток 076, 078, 082, 083 сероваров. Моноварные О-агглютинирующие сыворотки против вибрионов новых сероваров внедрены в работу лабораторий института "Микроб".

Обнаруженные новые серовары дополнили коллекцию отечественных типовых штаммов энтеропатогенных вибрионов и тем самым расширили возможности серотипирования выделяемых вибрионов и повысили надежность микробиологической диагностики.

### **Выводы**

1. Выявлены новые, ранее не известные серовары 076, 078, 082 и 083 энтеропатогенных вибрионов выделенные от больных острыми кишечными инфекциями людей. Штаммы обладали типичными морфологическими, физиологическими и биохимическими свойствами.

2. С помощью иммунологических методов получены новые данные об антигенной структуре энтеропатогенных вибрионов 076, 078, 082 и 083 сероваров. В клетках каждого из выделенных вибрионов новых сероваров обнаружено кроме одного строго специфичного для данного штамма термостабильного и термолабильного антигенов от 1 до 4 «О» и от 3 до 5 «ОН» антигенных комплекса известных

сероваров.

3. Разработана технология приготовления диагностических О-агглютинирующих моноклональных сывороток против вибрионов 076, 078, 082 и 083 сероваров для серологической идентификации энтеропатогенных вибрионов, выделенных от больных острыми кишечными инфекциями людей.

4. При серологической идентификации 304 штаммов энтеропатогенных вибрионов частота обнаружения вибрионов 076 серовара составляла - 2,96 %; 078 серовара - 0,65 %; 082 серовара - 2,96 %; 083 серовара - 3,94 %.

5. С помощью дот-иммуноанализа и реакции ПЦР установлено, что изучаемые штаммы продуцировали токсин отличающийся от холерного, но вызывающий энтеропатогенные заболевания у людей.

#### **Работы, опубликованные по теме диссертации:**

1. Щуркина И.И., Казакова Е.С., Лукъянова О.И., Елисеев Ю.Ю., Резников Ю.Б., Сомова Г.А. Совершенствование метода серологической идентификации энтеропатогенных вибрионов //Тез.докл. 6 съезда микробиологов и паразитологов - Нижний Новгород, 1991. Т. 1-М.,1991-с.151-.

2. Адамов А.К., Казакова Е.С., Елисеев Ю.Ю., Резников Ю.Б. Щуркина И.И., Сомова Г.А. "Штамм бактерий *Vibrio Nag* серовара 076, используемый для приготовления диагностической сыворотки: А.С. 1632033 СССР, МКИ с 12 № 1/20, А 61 К 39/104. -№ 4715422/13; Заявл.06.07.89; Оpubл. 15.02.92. Бюл. №6 //Изобретения, -1992. - № 6. - С.249

3. Адамов А.К., Резников Ю.Б., Елисеев Ю.Ю., Щуркина И.И., Сомова Г.А., Белоногова Г.И. "Штамм бактерий *Vibrio Nag* серовара 078, используемый для изготовления диагностической сыворотки" А.С.1668390 СССР. МКИ с 12 № 1/20, А 61 к 39/106. -№ 4715377/13; Заявл. 06.07.89; Оpubл. 07.08.91, Бюл. № 29 //Открытия. Изобретения. 1991. -№ 29. - С.110.

4. Адамов А.К., Щуркина И.И., Андрусенко И.Т., Шепелев А.П. Фрунзе О.В., Корешкова Е.А., Елисеев Ю.Ю., Резников Ю.Б., Сомова Г.А., Белоногова Г.И. "Штамм бактерий *Vibrio Nag* серовара



082, используемый для изготовления диагностической сыворотки" А.С. 1733468 СССР, МКИ С 12 № 1/20, А 61 к 39/40 - №4856625/13; Заявл. 12.06.90; Оpubл. 15.05.92, Бюл. №18 //Изобретения.-1992. - № 18. - С.96.

5. Адамов А.К., Елисеев Ю.Ю., Резников Ю.Б., Сомова Г.А., Белоногова Г.И., Лукьянова О.И. "Штамм бактерий *Vibrio Nag* серовара 083, используемый для изготовления диагностической сыворотки" А.С. 1726510 СССР, МКИ с 12 № 1/20, А 61 К 39/40. -№ 4838851/13; Заявл. 12.06.90; Оpubл. 15.04.92, Бюл. № 14 //Изобретения. -1992 - № 14. - С.104.

6. Щуркина И.И., Адамов А.К., Лукьянова О.И., Казакова Е.С., Сомова Г.А., Малахаева А.Н. Активность диагностических сывороток против холерных вибрионов не 01 серологической группы 02-083 сероваров при длительном хранении //Сб.науч.трудов - Повороссийск, 1994-вып.1, с. 135.

7. Сомова Г.А., Щуркина И.И., Адамов А.К. Антигенное строение 076,078,082 и 083 сероваров холерных вибрионов не 01 группы и их распространение //Сб.научн.трудов- Повороссийск-1994-вып.1-с.147.

8. Адамов А.К., Щуркина И.И., Сомова Г.А., Елисеев Ю.Ю., Об антигенах холерных вибрионов синтезируемых в организме лабораторных животных //Актуал.пробл.профилактик.особо опасн. природноочагов.инф.болезней- 1994- Иркутск.- с.9.

9. Сомова Г.А., Андрусенко И.Т., Лукьянова О.И., Щуркина И.И., Адамов А.К. Свойства новых 082 и 083 сероваров энтеропатогенных вибрионов //Актуал.пробл.профилактик.особо опасн.природ. очагов. инф.болезней- Иркутск- 1994- с.139.

10. Адамов А.К., Щуркина И.И., Сомова Г.А. Некоторые особенности серологической диагностики холерных вибрионов не 01 группы. Принципы и практика борьбы с холерой в республике Дагестан //Актуальн.вопр.разработки микробнол.питат.сред и тестсистем: матер.докл.Всерос.науч-практ.конф., 31 окт.1994- Махачкала- 1994- с.64.

11. Наумов А.В., Адамов А.К., Щуркина И.И., Игонина Н.В., Резников Ю.Б., Лукьянова О.И., Казакова Е.С., Сомова Г.А., Зинина О.С., Ломов Ю.В., Воронежская Л.Г., Андрусенко И.Т., Мазрухо Б.А., Иванова Л.В., Медунин П.В., Озерцовский Н.А. Сыво-

ротки холерные не 01 группы поливалентная, групповые и моноварные кроличьи жидкие для РА //Регламент производства №54195 от 10.X.1995,срок действия до 9 окт.2000 года.

12. Адамов А.К., Щуркина И.И., Казакова Е.С., Лукьянова О. И., Андрусенко И.Т., Сомова Г.А., Абрамова Е.Г., Маркова В.Ю. Термостабильные О-антигены холерных вибрионов не 01 группы 02-083 сероваров //УДК 616. 932; 576,851.3:576.8097,Российский н-и противочумн.ин-т "Микроб", Саратов,1995-Деп. в ВИНТИ,10.07.95, №2079-В95.

13. Сомова Г.А. Изучение термостабильных и термолабильных антигенов холерных вибрионов не 01 группы 076, 078, 082 и 083 сероваров //Эколого-эпид.надзор за природ-очаг. инф. в Сев. Прикаспии: Сб.науч.тр. - Астрахань, 1996- с.123-.

14. Сомова Г.А. Получение новых диагностических моноварных сывороток 076, 078, 082 и 083 сероваров для идентификации энтеропатогенных вибрионов //Гомеостаз и инфекционный процессСаратов- 1998- с.65.