МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

Всесоюзный ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный институт
"Микроб"

# МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

# МЕТОД МИКРООБЪЕМНОЙ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Саратов 1988

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

Всесоюзный ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"

Начальник Главного управления
карантинных инфекций Минздрава
С С С Р

М.И.Наркевич

24 марта 1988 г.

# МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

# МЕТОД МИКРООБЪЕМНОЙ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Саратов 1988

Микротитровальная техника в настоящее время широко внедряется в практику лабораторной диагностики многих инфекций. Это значительно экономит диагностические бактерийные препараты и рабочее время. В методических рекомендациях описан метод постановки реакции агглютинации холерных вибрионов со специфическими агглютинирующими сыворотками в микрообъемах с использованием специальных полистероловых планшеток для иммунологических реакций и микротитровальных игл, а также стереомикроскопа с приспособлением для косого освещения. Вся реакция осуществляется в объеме 0,I мл.

Методические рекомендации составили: Д.Л.Шмеркевич, Т.Н. Донская, Н.С.Огнева, Н.А.Маторина, О.С.Трушева, Н.И.Миронова, В.Г.Мацуга.

## ВВЕДЕНИЕ

При бактериологической диагностике холеры ведущим признаком идентификации выделенной культуры является ее способность агглютинироваться специфическими холерными сыворотками (видовой-О и серологических вариантов - Огава и Инаба, а также RO-сывороткой для диссоциирующих штаммов).

Постановка развернутой реакции агглютинации с четырьмя сыворотками довольно трудоемка и требует использования большого количества пробирок (25 на каждый штамм).

В методических рекомендациях предлагается ставить реакции агглютинации при диагностике холеры в микрообъемах с использованием специальных полистероловых планшеток для иммунологических реакций, микротитровальных игл из набора микротитратора Такачи и стереомикроскопа с приспособлением для косого освещения.

Предлагаемый метод менее трудоемок по сравнению с пробирочным, специфичен, чувствителен и стандартен. Его использование позволяет проводить окончательный учет через 2 ч после постановки реакции. Он дает экономический эффект по сравнению с пробирочным методом - 20 руб. на каждые 100 реакций. Метод получил положительную оценку при комплексной апробации специалистами института "Микроб", РПЧИ, НИПЧИ Кавказа и Закавказья, НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока и ряда противочумных станций (10 актов внедрения).

Методические указания предназначены для научных, производственных и практических лабораторий противочумных институтов, станций и отделений.

## I. ОБОРУДОВАНИЕ

I. Полистероловые планшеты для иммунологических реакций с прозрачными крышками.

2. Иглы титровальные объемом 0,05 мл из набора микротитратора Такачи.

3. Пипетки-капельницы из того же набора.

4. Пастеровские пипетки.

5. Кюветы эмалированные, фаянсовые или стеклянные.

6. Стереомикроскоп с приспособлением для косого освещения.

## II. МЕТОД ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ

Сухую сыворотку растворяют в дистиллированной водой и разводят в 0,85% растворе NaCl (pH 7,2-7,4).

Взвесь исследуемой культуры готовят в 3-4 мл 0,85% раствора NaCl из 6-I8-часовой агаровой культуры, до концентрации $2 \cdot I0^9$ м.к. в I мл, что соответствует I0 единицам стандарта мутности ГИСКа им.Л.А.Тарасевича.

Пластинки (предварительно отмытые и хорошо просушенные) маркируют, надписывая с левой стороны карандашом номер исследуемого штамма, наименование сывороток, а сверху ставят разведение сывороток (I:I00, I:200 и т.д. до рабочего титра). В лунки каждого ряда пастеровской пипеткой вносят по 0,05 мл (2 капли) 0,85% раствора хлористого натрия. Затем в первую лунку вносят 0,05 мл соответствующей сыворотки в разведении I:25 и проводят двукратные ее разведения микротитровальной иглой из микротитратора Такачи объемом 0,05 мл. Из последней лунки 0,05 мл сыворотки удаляют этой же иглой, помещая ее в $96^0$ спирт с последующим обжиганием. После титрации всех сы-

вороток в каждую лунку вносят пастеровской пипеткой 0,05 мл взвеси исследуемой культуры в концентрации $2 \cdot 10^9$ м.к. в I мл.

Пластинку накрывают крышкой и ставят в термостат при 37°С на 2 ч, после чего проводят учет реакции в косо проходящем свете под стереомикроскопом МБС-I или МБС-2.

## III. УЧЕТ РЕАКЦИИ

Реакцию оценивают по четырехбалльной системе, просматривая пластинки под микроскопом:

++++ (4+) - полная агглютинация - наличие на дне лунки рыхлой разорванной пленки, четких хлопьев на фоне темного поля;

+++ (3+) - неполная - наличие нежной пленки и полиморфных комочков агглютината на темном фоне;

++ (2+) - слабая - наличие мелких хлопьев на фоне сероватого поля;

+ (I+) - следы агглютинации - единичные мелкие хлопья на фоне мутной жидкости.

Реакцию оценивают отрицательно, когда в лунке вибрионы равномерно выстилают дно или собираются в "пуговку". Под микроскопом видно равномерное мелкозернистое поле без темных промежутков.

Положительной считают реакцию при наличии агглютинации (не менее чем на 2+).

К V.cholerae OI ( cholerae , eltor ) относятся культуры, агглютинирующиеся сыворотками OI до диагностического титра.

Серовар культуры вибриона определяют по ее взаимодействию в реакции агглютинации с типоспецифическими сыворотками Огава и Инаба не менее чем до I/2 титра сыворотки. Культуры, реагирующие с сыворотками обеих вариантов не менее чем до I/2 титра, относятся к серовару Гикошима.

При выполнении исследования возможны ошибки в случае недостаточной чистоты микротитровальных планшеток, исчерченности лунок, а также неполного заполнения микротитровальных игл при титрации сывороток.

Противопоказанием для применения данного метода является отсутствие условий для выполнения требований противоэпидемического режима работы.

## IУ. РЕЖИМ РАБОТЫ ПРИ ПОСТАНОВКЕ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ МИКРОМЕТОДОМ

Работа проводится в костюме 4 типа, дополненного резиновыми перчатками.

Реакцию ставят в микрообъемах, используя микротитровальные планшетки для иммунологических реакций объемом 0,4 мл.

Подготовка планшеток и титрация холерных агглютинирующих сывороток О, Инаба, Огава, RO проводится на чистом столе.

Дальнейшую работу осуществляют с соблюдением Инструкции о противоэпидемическом режиме работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний I-П групп (Саратов, 1979). Дополнительно предусматривают следующее.

Микротитровальные планшетки помещают на поднос (эмалированный, стеклянный, фаянсовый). На дно подноса предварительно расстилают марлевую салфетку, смоченную дезраствором (3% раствор хлорамина, карболовой кислоты).

После этого в каждую лунку пипеткой-капельницей вносят 0,05 мл взвеси холерных вибрионов в дозе $2 \cdot 10^9$ м.т./мл.

Затем микротитровальную планшетку накрывают крышкой и на подносе ставят в термостат при 37°С на 2 ч.

При проведении учета реакции поднос с микротитровальной

планшеткой переносят на лабораторный стол; планшетку ставят на стеклянную подставку и просматривают в косо проходящем свете с помощью микроскопа МБС-I (МБС-2).

При учете реакции крышку с микротитровальной планшетки не снимают. В случае запотевания крышки ее меняют на другую, а запотевшую помещают в емкость с 5% раствором хлорамина.

После учета реакции планшетку и крышку складывают в ювет, заливают (5% хлорамином), накрывают и оставляют на 24 ч. В этом случае необходимо обратить внимание, чтобы все лунки пластинок были заполнены дезраствором. Если имеются пузырьки воздуха в лунках, необходимо осторожно погрузить пластинку в дезраствор, манипулируя при этом пипеткой, которую обеззараживают в дезрастворе. Стеклянную крышку столика из-под косого освещения обрабатывают 70° спиртом.

## ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

### к методическим рекомендациям "Метод микрообъемной реакции агглютинации для идентификации холерных вибрионов"

Реакция агглютинации при лабораторной диагностике холеры широко применяется для идентификации и изучения выделенных штаммов холерного вибриона. Каждый штамм согласно Инструктивно-методическим указаниям по лабораторной диагностике холеры (Москва, 1984) должен быть проверен в развернутой реакции агглютинации с агглютинирующими видовыми О- и КО - сыворотками и типоспецифическими Огава и Инаба сыворотками. Это требует большой затраты рабочего времени, расхода бактерийных препаратов и бактериологических пробирок. Для изучения 25 штаммов (100 реакций агглютинации) требуется затратить полный рабочий день одного лаборанта, 1/2 рабочего дня врача, израсходовать 150 мл агглютинирующих сывороток (1:100), 625 пробирок. С учетом подготовительной работы и последующей работы по обеззараживанию пробирок, их мытью, пробкованию и т.д. ясно, как загружает эта работа все подразделения бактериологической лаборатории.

В представленных методических рекомендациях описан видоизмененный и усовершенствованный метод (1-3) постановки реакции агглютинации холерных вибрионов со специфическими агглютинирующими сыворотками в микрообъемах с использованием специальных полистероловых планшеток, вышедших из употребления после иммуноферментного анализа и микротитровальных игл из микротитратора Такачи, а также стереомикроскопа с приспособлением для косого освещения. Вся реакция осуществляется в объеме 0,1 мл.

В целях обеспечения безопасности работы составлено наставление по соблюдению требований противоэпидемического режима при

выполнении этого метода, которое одобрено режимной комиссией и утверждено директором института "Микроб" 29 мая 1984 г.

Исследования показали, что все холерные вибрионы классического и эльтор биоваров агглютинировались холерной видовой О-сывороткой в микрообъемах. В пробирках реакция агглютинации зарегистрирована в 90% случаев (таблица).

Что касается агглютинабельности типоспецифическими сыворотками, то прослеживается следующая закономерность: при постановке с сывороткой Инаба в микрометоде агглютинировались 100, а в пробирках - 90% штаммов классического холерного вибриона серовара Инаба. Холерные вибрионы биовара эльтор серовара Инаба агглютинировались в планшетках и пробирках соответственно в 95 и 96% случаев. У холерных вибрионов классического и эльтор биоваров серовара Огава соотношения в обеих методиках были практически те же.

Интересен факт, что при постановке реакции агглютинации с RO-сывороткой наибольшее число штаммов (4), агглютинирующихся RO-сывороткой до титра, было выявлено в микрометоде; в пробирках агглютинация установлена у одного штамма (таблица). Очевидно, это объясняется тем, что при учете реакции агглютинации под стереомикроскопом увеличивается возможность улавливать наличие мелкохлопчатого агглютината, который не виден простым глазом.

Все штаммы вибрионов 040-056 сероваров в микрометоде не агглютинировались холерными агглютинирующими сыворотками, а в пробирках штамм II 258-1099 (040-серовара) агглютинировался всеми холерными сыворотками.

Большинство изученных штаммов представителей семейства Enterobacteriaceae также не агглютинировались холерными

агглютинирующими сыворотками, за исключением Sh. flexneri 2503, у которого в пробирках была выявлена агглютинация со всеми сыворотками штамма S.typhimurium 2I, у которого отмечена неспецифическая реакция агглютинации со всеми сыворотками как в пробирках, так и в планшетках.

Совпадение результатов реакции агглютинации культур холерных вибрионов при постановке микрометодом и в пробирках

| Вид микроба | Серовары | Кол-во изучаемых штаммов | Агглютинация до диагностического титра с сыворотками | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | О | RO | Инаба | Огава |
| V.cholerae cholera | Инаба | I3 | I3/I3* | - | I3/II | I/I |
| | Огава | 24 | 24/24 | 4/I | I/- | 24/23 |
| V.cholerae eltor | Инаба | 24 | 23/23 | - | 2I/22 | I/2 |
| | Огава | 37 | 37/36 | - | - | 34/34 |
| V.cholerae не OI серовара | 040 | I | -/I | -/I | - | -/I |
| | 04I | I | - | - | - | - |
| | 042 | I | - | - | - | - |
| | 043 | I | - | - | - | - |
| | 044 | I | - | - | - | - |
| | 056 | I | - | - | - | - |
| | Не типированный | I | - | - | - | - |
| Представители сем. Enterobacteriaceae | - | I7 | I/I | I/2 | 2/I | I/I |

* В числителе - результаты агглютинации микрометодом, в знаменателе - в пробирках.

Результаты реакции агглютинации при постановке ее микрометодом через 2, 6, 18-20 ч и 2-3 сут оказалась идентичными, в связи с чем окончательную серологическую идентификацию в планшетках проводили через 2 ч после экспозиции в термостате.

Десятикратное повторение реакции 26 штаммов холерных вибрионов микрометодом со всеми холерными сыворотками дало совпадающие результаты как по титрам, так и по характеру агглютинации, что говорит о стандартности метода.

При использовании этого метода расход агглютинирующих сывороток уменьшался в 10 раз, сокращалось время, необходимое для постановки реакции и ускорялся срок выдачи ответа. Описанный метод менее трудоемок. Экономический расчет затрат бакпрепаратов и рабочего времени на постановку 100 реакций показал, что микрометод дает экономию в размере 20 руб.

Метод прошел апробацию в лабораториях 4 противочумных институтов и 4 противочумных станций и получил положительную оценку при комиссионной проверке специалистов института "Микроб".

Чувствительность, стандартность, достоверность полученных результатов, воспроизводимость в практических лабораториях, высокая экономичность позволяют использовать этот метод для постановки объемной реакции агглютинации при изучении штаммов холерных вибрионов и их популяций по признаку агглютинабельности.

## Литература

1. Бененсон А., Аниса Г., Поль А. // Бюл. ВОЗ. - Женева, 1968, Т.38. - № 2. - С.260-270. - 2. Бененсон А., Аниса Г., Мосли У. - Там же. - С.270-279. - 3. Вейнблат В.И. // Тез. докл. Всес.науч.практ. конф. - Ставрополь, 1983. - С.336-337.

НГ 38612 Подписано к печати
Формат 60х84 I/I6. Печ. л. 0,75.
Тираж 600. Заказ 2059 Цена I5 коп.

Всесоюзный ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт "Микроб".
Саратов, Университетская, 46

Саратов. Ротапринт типографии № 6.