

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Главного санитарно-
эпидемиологического управления
Министерства здравоохранения
С С С Р

А.Павлов

25 октября 1968 г.

№ 760а - 68

И Н С Т Р У К Ц И Я^х)
по применению реакции непрямой гемагглютинации
(РНГА) для обнаружения столбнячного микроба в
объектах внешней среды

Метод обнаружения столбнячного микроба с помощью реакции непрямой гемагглютинации является высоко специфичным и может быть применен в лабораториях санэпидстанций, больниц, научно-исследовательских институтах, как вспомогательный метод исследования с целью установления обсемененности предметов внешней среды, при проверке запыленности больничных помещений, проверке на стерильность перевязочного материала и др.

І. Объекты и цели исследования

Исследование на наличие столбнячного микроба производится в следующих случаях:

- а) при изучении краевой эпидемиологии столбняка с целью установления степени обсемененности *Ci tetani* почвы, пыли, растений и других объектов внешней среды;
- б) при проведении плановых санитарно-гигиенических ана-

х) Инструкция подготовлена сотрудниками ордена Трудового Красного Знамени Института эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи АМН СССР Т.И.Сергеевой, К.И.Матвеевым и Т.И.Булатовой.

лизов на запыленность больничных помещений: палат, перевязочных, предоперационных, операционных, родильных и детских отделений, а также при проверке на стерильность перевязочных материалов, кетгута, шелка, лекарственных средств и т.п.;

в) при анализе материалов от больных с целью подтверждения диагноза и от трупов — для постмортального заключения.

П. Взятие проб для исследования

1. Пробы почвы берутся в стерильные бактериологические пробирки с резиновыми пробками. Пробы почвы следует брать на расстоянии трех-пяти метров друг от друга в населенных пунктах (дворы, скотные дворы, огороды, сады, дороги, улицы, детские и спортивные площадки и т.д.), а также в лугах, полях, пастбищах, лесах, на берегах рек.

Для взятия почвы пробирка извлекается из стерильного бумажного пакета, нижней частью пробирки сдвигается поверхностный слой почвы в 3-5 см, затем открытым концом пробирки путем винтообразного движения вглубь набирается почва, после чего плотно закрывается^{х)}. На пробирке делают надпись: место взятия почвы, номер пробы, дата. Листья, растения и другие объекты помещаются в стерильную посуду.

2. Для взятия пыли в помещениях необходимо заготовить тампоны из ваты на палочке, смочить тампоны физиологическим раствором, вложить их в пробирки, закрыть пробирки резиновыми пробками и простерилизовать в автоклаве. Взятие пыли производится следующим образом: тампоны извлекаются за кончик палочки из пробирки и влажным тампоном собирают пыль с поверхности предметов, после чего опять помещают в пробирку, которая закрывается пробкой и подписывается.

Для анализа перевязочные средства, образцы кетгута,

^{х)} Применение шпателей для снятия поверхностного слоя почвы затруднено, так как требуется на каждую пробу специальный шпатель.

шелка, лекарств направляются в заводской упаковке, или же из них делается выборочное взятие стерильными инструментами тампонов, марлевых салфеток, ваты и других материалов, которые помещаются в стерильную посуду с надписью, содержащей название материала, место взятия и дату.

3. При подозрении на столбняк от больных берут на исследование содержимое раны, отторгнутые ткани, инородные тела, извлеченные из ран, перевязочные средства (тампоны, дренажные трубки, кетгут, шелк и т.д.). При криминальных абортах следует брать тампоном выделения из шейки матки. В случае подозрения на столбняк у новорожденного необходимо взять на исследование ~~из~~ ^{ткань} пупочной ранки, тампоны, повязки, шелк, использованные для перевязки пуповины. От трупов следует брать кусочек мышечной ткани из предполагаемого места внедрения инфекции и содержимое раны. Для взятия материала на исследование применяются стерильные инструменты и посуда. Пробы этикеткируются, где указывается название материала, фамилия, имя, отчество больного или трупа, дата взятия. Все пробы до исследования должны храниться при температуре не выше 4°.

III. Посев исследуемых материалов

Исследование всех вышеуказанных материалов производится путем посева их на жидкую среду и дальнейшего исследования культуральной жидкости посевов с помощью реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

Для посевов используется бульон Глузмана или бульон Вейнберга с кусочками мяса под вазелиновым маслом при рН 7,2-7,4, разлитые по 70 мл во флаконы емкостью 100 мл.

Перед посевом флаконы со средой прогревают на водяной бане при 100° в течение 10 минут для регенерации среды, после чего охлаждают до 45°.

В каждый флакон перед посевом добавляют по 0,5% стерильного 40% раствора глюкозы (1 мл на флакон).

Посев почвы производится следующим образом: в пробирку с пробой почвы добавляют равный объем физиологического раствора, после чего почва тщательно перемешивается пастеровской пипеткой, спустя 40–60 минут выдерживания при комнатной температуре по 2–3 мл почвенной суспензии вносится во флакон со средой.

Тампон с пылью извлекают за палочку из пробирки, осторожно отделяют его пипеткой от палочки и целиком помещают в питательную среду. Листья, растения и другие предметы помещают стерильным пинцетом во флакон со средой.

Перевязочные и другие материалы, проверяемые на стерильность, исследуют в специальных стерильных боксах и одежде с соблюдением правил асептики. Приблизительно по 2–3 гр. материала (тампоны, бинты, вата, кетгут, шелк и т.д.) извлекают стерильными инструментами и помещают в среду.

Кусочки тканей, взятые из трупов, предварительно измельчаются, а затем вносятся в питательную среду; содержимое ран, тампоны и другие материалы от больных засеваются так же, как указано выше.

Все посевы помещают в термостат при 37°. При наличии роста исследование посевов следует начинать спустя 48 часов после посева.

Посевы материалов, подвергавшихся стерилизации (перевязочные средства, кетгут, шелк), необходимо при отсутствии видимого роста выдерживать в термостате до 2-х недель. Трех-четырёх-суточные посевы испытуемых материалов исследуются методом реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и микроскопированием.

IV. Материалы и реактивы, необходимые для постановки РНГА

Для постановки РНГА необходимы следующие реактивы и материалы:

1) Реактивы для приготовления буферных растворов:

1/15 М $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1/15 М KH_2PO_4

физиологический раствор

2) Танин

3) Противостолбнячная сыворотка, очищенная и концентрированная методом "Диаферм-3" активностью 1000-1500 АЕ в 1 мл.

4) Бараньи эритроциты (нативные, консервированные в растворе Олсвера или формализированные эритроциты).

5) Нормальная кроличья сыворотка.

6) Столбнячный очищенный, концентрированный, но не адсорбированный анатоксин, активностью 150-200 ЕС в 1 мл.

7) Доски для гемагглютинации из плексигласа с 72 лунками. Объем лунки 2 мл.

8) Шприц непрерывного действия на 1 мл.

9) Пипетки градуированные на 1, 2, 5 мл.

Приготовление буферных растворов

Для приготовления 1 литра 1/15 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ раствора берется 11,88 г реактива и добавляется до 1 литра физиологический раствор.

Для приготовления 1 литра 1/15 М KH_2PO_4 раствора берется 9,08 г реактива и добавляется до 1 литра теплый (45°) физиологический раствор. Из этих исходных растворов готовятся буферные растворы для постановки РНГА.

Буфер с pH 6,4

1/15 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	- 61,1 мл	}	100 мл
1/15 М KH_2PO_4	- 38,9 мл		

Буфер с pH 7,0

1/15 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	- 53,4 мл	}	240 мл
1/15 М KH_2PO_4	- 186,6 мл		

Для получения большего количества буферных растворов составные части увеличивают в нужное число раз. Буферные растворы изготавливают заранее, контролируют их pH и сохраняют при $4-10^{\circ}$.

Приготовление раствора танина

Для танинизирования эритроцитов используется медицинский порошкообразный танин. Рабочим разведением танина является разведение его в физиологическом растворе в соотношении 1:20000.

Сначала готовят исходный раствор танина, который можно сохранять в холодильнике при $4-10^{\circ}$ в течение 2-3-х недель и использовать для работы.

Для приготовления исходного раствора взвешивают на торсионных или аналитических весах 10-12 мг танина и помещают в пробирку, куда добавляют физиологический раствор до концентрации 1 мг/мл, в результате чего получают разведение танина 1:1000. Для получения разведения 1:20000 исходный раствор разводят в 20 раз (1 мл исходного раствора + 19 мл физиологического раствора).

Противостолбнячная сыворотка "Диаферм-3" должна быть первоначально апробирована в РНГА со столбнячным анатоксином или токсином, так как не всякая серия сыворотки бывает пригодна для сенсibilизации эритроцитов. Методика проверки сыворотки изложена ниже.

Бараньи эритроциты

Для РНГА лучше использовать эритроциты, консервированные в растворе Олсвера, которые при хранении в холодильнике могут быть применены для РНГА в течение 3-4-х недель.

Раствор Олсвера для консервации эритроцитов:

- 1) Глюкоза - 2,05 г
- 2) Димонноокислый Na - 0,8 г
- 3) Хлористый Na - 0,42 г

4) Дистиллированная вода - до 100 мл

Установить pH - 6,1-6,2 , стерилизовать 2 раза по 30 минут текучим паром. Кровь из барана берется в стерильную посуду с раствором Олсвера в соотношении 1:1.

Для РНГА можно использовать также формализированные эритроциты и танизированные по методу М.И.Леви (1962,1967), которые в течение нескольких месяцев сохраняют свои свойства.

У. Методика постановки реакции

Приготовление танизированных эритроцитов

По 3-5 мл нативных и консервированных эритроцитов барана отмывают 4-5 раз физиологическим раствором в центрифуге при 2500-3000 об/мин по 5-7 минут. Прозрачную бесцветную надосадочную жидкость сливают, по 0,15 мл осадка отмытых эритроцитов помещают в центрифужные пробирки, куда вносят 4 мл физиологического раствора и 4 мл рабочего разведения танина (1:20000), смесь выдерживают при 37° в течение 10 минут и отмывают:

а) Смесь центрифугируют 5-7 минут при 3000 об/мин, надосадочную жидкость сливают.

б) Осадок отмывают физиологическим раствором 2 раза.

Сенсибилизация эритроцитов противостолбнячной сывороткой

К осадку отмытых танизированных эритроцитов добавляют 3 мл противостолбнячной сыворотки, разведенной 1:10 буферным физиологическим раствором с pH - 6,4. Смесь выдерживают при 37° в течение 1 часа, после чего отмывают на центрифуге:

а) центрифугируют 5-7 минут при 3000 об/мин, надосадочную жидкость сливают;

б) осадок отмывают 4 мл буферного физиологического

раствора с pH 6,4, надосадочную жидкость сливают;

в) осадок отмывают буферным физиологическим раствором pH 6,4 с 1% нормальной инактивированной при 56° 30 минут кроличьей сывороткой, надосадочную жидкость сливают;

г) осадок суспендируют в 6 мл буферного раствора pH 6,4 с 1% нормальной инактивированной кроличьей сывороткой — получается 2,5% взвесь тагизированных сенсibilизированных противостолбнячной сывороткой эритроцитов.

Сенсibilизация тагизированных ~~эритроцитов~~ формалинизированных эритроцитов производится следующим образом: 5 мл 2,5% взвеси эритроцитов отмывают физиологическим раствором, к осадку добавляют противостолбнячную сыворотку в указанном количестве, смесь выдерживают в термостате 2 часа, после чего отмывают, как указано выше, и взвешивают в 5 мл физиологического раствора с pH 6,4 и 1% нормальной кроличьей сывороткой (инактивированной).

Разведение исследуемого материала

Из посевов исследуемого материала на жидкие питательные среды спустя 48 часов инкубации при 37° берут по 0,5 мл культуральной жидкости, делают мазок на предметном стекле для микроскопирования, а затем разводят в 5 раз буферным физиологическим раствором pH 7,0 и 0,4% нормальной кроличьей инактивированной сывороткой (1:250).

Во все лунки доски для гемагглютинации разливают по 0,5 мл буферный раствор pH 7,0 с 0,4% кроличьей сыворотки. В I-ю лунку вносят 0,5 мл разведенной в 5 раз культуральной жидкости, далее делают последовательные 2-кратные разведения исследуемого материала путем переноса из лунки в лунку по 0,5 мл смеси, из предпоследней лунки 0,5 мл выливают, последняя лунка остается для контроля. Таким образом получают разведения испытуемой культуральной жидкости от 1:10 до 1:10240^{х)} (схема I).

х) При апробации противостолбнячных сывороток таким же образом разводят столбнячный анатоксин или столбнячный токсин.

Схема I

	I:10	:	I:20	:	I:40	:	I:80	:	I:160	:	I:320	:	I:640	:	I:1280	:	I:2500	:	Контр.
	:		:		:		:		:		:		:		:		:	и т.д.	:
№ 1	0,5 мл		0,5 мл		0,5 мл		и т.д.												0,5 мл
	исходного разведе- ния																		
№ 2																			0,5 мл
№ 3																			0,5 мл
№ 4																			0,5 мл
№ 5																			0,5 мл
№ 6	0,5 мл		0,5 мл		0,5 мл		и т.д.												0,5 мл
	столб.анатоксина или токсина																		
																			0,5 мл

В первую лунку каждого из 5 горизонтальных рядов вносят исходные разведения пяти исследуемых культур (№ 1-5). В 6-й ряд вносят 0,5 мл столбнячного анатоксина или токсина и разводят также (контроль активности сенсibilизированных эритроцитов). После приготовления разведений испытуемого материала в каждую лунку, включая и контрольные, вносят по 0,1 мл взвеси танизированных сенсibilизированных сывороткой эритроцитов. Содержимое лунок тщательно перемешивают путем осторожного встряхивания и доски помещают в термостат на 1 час при 37°, а затем оставляют при комнатной температуре. Предварительный учет результатов реакции производят через 2-3 часа, окончательный через 18 часов.

Учет результатов

Учет результатов производится визуально по следующей схеме:

- (+) - положительная реакция: равномерная агглютинация эритроцитов, лунка заполнена гомогенной розовой взвесью,
- (±) - учитываемая крайняя положительная реакция: зона агглютинированных эритроцитов несколько меньше диаметра лунки и окружена красным тонким ободком эритроцитов;
- (-) - отрицательная реакция: зона эритроцитов занимает половину или менее диаметра лунки и окружена плотным красным ободком или представляет собой плотный красный диск ("пуговка"), лежащий на дне лунки.

За положительный результат следует считать (+) или (±) реакцию в разведении 1:20 и выше испытуемого материала, (т.е. - во 2-й и последующих лунках горизонтального ряда доски) при отрицательном контроле в вертикальном 12-м ряду и положительном - в 6-м горизонтальном ряду в разведении не менее 1:1280-1:2560 х).

х) При контроле противостолбнячных сывороток следует отбирать для работы те серии сывороток, которые дают положительный результат в РНГА с анатоксином или токсином в разведении не менее чем до 1:2560 - 1:5120.

II

Мазки, приготовленные из каждого исследуемого посева, фиксируют над пламенем, окрашивают по Граму и микроскопируют. Наличие в препарате грам-положительных палочковидных микробов со спорами в виде барабанной палочки при положительной РНГА с данным посевом указывает на наличие возбудителей столбняка в исследуемом материале.

При наличии в препарате микробов, похожих на *Cl tetani* и сомнительной реакции гемагглютинации, необходимо повторить РНГА на 5-6-е сутки выращивания посевов, а также поставить биологическую пробу на белых мышах.

Для этого нужно развести испытуемую культуральную жидкость в 5 раз и ввести по 0,5 мл двум белым мышам в мышцу задней лапки. Появление признаков столбняка (напряжение хвоста и конечности на стороне введения, изгибание позвоночника, судороги) у мыши свидетельствуют о наличии столбнячного микроба.

При выделении чистой культуры с целью идентификации столбнячного микроба путем посева на высокий столбик высевы отдельных колоний на жидкую среду следует проверять также по указанной методике.

Д-93090 от 20/ХП-68 года. Тираж 500 экз. Заказ 533

ИЗМ им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР