

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
Всесоюзный ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противоочумный институт
"Микроб"

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
МЕТОД МИКРООБЪЕМНОЙ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Саратов 1988

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
Всесоюзный ордена Трудового Красного Знамени научно-
исследовательский противоочумный институт "Микроб"

Начальник Главного управления
карантинных инфекций Минздрава
СССР

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 бактериальные препараты и рабочее время. Рекомендациях описан метод постановки реакции агглютинации холерных вибрионов со специфическими агглютинирующими сыворотками в микрообъемах с использованием специальных полистероловых пластинок для иммunoхимических реакций и микротитровальных игл, а также стеросомикропипетки с приспособлением для косого освещения. Вся реакция осуществляется в объеме 0,1 мл.

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

ВВЕДЕНИЕ

При бактериологической диагностике холеры ведущим признаком идентификации выделенной культуры является ее способность агглютинироваться специфическими холерными сыворотками (видо-вой-О и серологических вариантов - Огала 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", РИМи, НИПЧИ Кавказа и Закавказья, НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока и ряда противоочумных станций (10 актов внедрения).

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

I. ОБОРУДОВАНИЕ

1. Полистероловые планшеты для иммунологических реакций с прозрачными крышками.
2. Иглы титровальны^и с 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 дистиллированной водой и разводят в 0,85% растворе NaCl (pH 7,2-7,4).

Весь исследуемой культуры готовят в 3-4 мл 0,85% раствора NaCl из 6-18-часовой агаровой культуры, до концентрации $2 \cdot 10^9$ м.к. в 1 мл, что соответствует 10 единицам стандарта чистоты ГИСКа им. Л.А. Тарасевича.

Пластинки (предварительно отмытые и хорошо просушенные) маркируют, надписывая с легкой стороны карандашом номер исследуемого штамма, наименование сывороток, а сверху ставят разведение сывороток (1:100, 1:200 и т.д. до рабочего титра). В луночки 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 1:25 и проводят двукратные ее разведения микротитровальной иглой из микротитратора Такачи объемом 0,05 мл. Из последней луночки 0,05 мл сыворотки удаляют этой же иглой, поместив ее в 96° спирт с последующим обжиганием. После титрации всех сывороток вносят в каждую лунку 0,05 мл 0,85% раствора хлористого натрия и проводят титрование.

сывороток в каждую лунку вносят пастеровской пипеткой 0,05 мл взвеси исследуемой культуры в концентрации $2 \cdot 10^9$ м.к. в 1 мл.

Пластиинку накрывают крышкой и ставят в термостат при 37°C на 2 ч, после чего проводят учет реакции в косо проходящем свете под стереомикроскопом МСС-1 или МСС-2.

III. УЧЕТ РЕАКЦИИ

Реакцию оценивают в четырехбалльной системе, просматривая пластиинки 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 комочек агглютината на темном фоне;

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

+ (1+) - следы агглютинации - единичные мелкие хлопья на фоне мутной жидкости.

Реакцию оценивают отрицательно, когда в луночке 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* O1 (*cholerae*, *eltor*) относятся культуры, агглютинирующиеся сыворотками O1 до диагностического титра.

Серовар культуры вибриона определяют по ее взаимодействию в реакции агглютинации с типоспецифическими сыворотками Огава и Инаба не менее чем до 1/2 титра сыворотки. Культуры, реагирующие с сыворотками обеих вариантов не менее чем до 1/2 титра, относятся к серовару Гикошима.

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

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

IV. РЕЖИМ РАБОТЫ ПРИ ПОСТАНОВКЕ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ МИКРОМЕТОДОМ

Работа проводится в костюме 4 типа, дополненного резиновыми перчатками.

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

Подготовка пластиночек и титрация холерных агглютинирующих сывороток О, Инаба, Огава, РО 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-II групп (Саратов, 1979). Дополнительно предусматривают следующее.

Микротитровальные пластиночки 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 пластиночку накрывают крышкой и на подносе ставят в термостат при 37°C 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 МСС-1 (МСС-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 кювет, 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 O-и R0 - сыворотками и типоспецифическими Огава и Инаба сыворотками. Это требует большой затраты рабочего времени, расхода бактериальных 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, просушиванию и т.д. ясно, как загружает эта работа все подразделения бактериологической лаборатории.

В представленных методических рекомендациях описан видоизмененный и усовершенствованный метод (I-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 режимом этой комиссией и утверждено директором института "Микро" 29 мая 1984 г.

Исследования показали, что все холерные вибрионы классического и эльтор биоваров агглютинировались холерной видовой R0-сывороткой в микрообъемах. В пробирках реакция агглютинации зарегистрирована в 90% случаев (таблица).

Что касается агглютинальности 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 R0-сывороткой наибольшее число штаммов (4), агглютинирующихся R0-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 мелкохлопьеватого 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 микробы	Серовары	Инаба	Огава	Кол-во: Агглютинация до диагностического титра с сыворотками			
				изучаемых штаммов	0	RO	Инаба
<i>V.cholerae</i>	Инаба	I3	I3/I3 [*]	-		I3/II	I/I
<i>cholera</i>	Огава	24	24/24	4/I		I/-	24/23
<i>V.cholerae</i>	Инаба	24	23/23	-		2I/22	I/2
<i>eltor</i>	Огава	37	37/36	-		-	34/34
<i>V.cholerae</i>	040	I	-/I	-/I	-	-	-/I
не 0I серовара	041	I	-	-	-	-	-
	042	I	-	-	-	-	-
	043	I	-	-	-	-	-
	044	I	-	-	-	-	-
	056	I	-	-	-	-	-
Не типиро-ванный	I	-	-	-	-	-	-
Представите-ли сем.	-	I7	I/I	I/2		2/I	I/I
<i>Enterobacte-rioceae</i>							

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

Результаты реакции агглютинации при постанове ее микрометодом через 2, 6, 18-20 ч и 2-3 сут оказалась идентичными, в связи с чем окончательную серологическую идентификацию в планшетах 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 бакпрепарата и рабочего времени на постановку 100 реакций показал, что микрометод дает экономию в размере 20 руб.

Метод прошел апробацию в лабораториях 4 противоочумных институтов и 4 противоочумных 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.

Л и т е р а т у р а

- І. Бененоон А., Аниса Г., Поль А. // Бол. ВОЗ. - Женева, 1968, Т.38. - № 2. - С.260-270. - 2. Бененоон 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 60x84 1/16. Печ. л. 0,75.
Тираж 600. Заказ 2059 Цена 15 коп.

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

Саратов. Ротапrint типография № 6.