

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

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
МЕТОД МИКРОБЪЕМНОЙ РЕАКЦИИ АГГЛУТИНАЦИИ  
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 АГГЛУТИНАЦИИ  
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. 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 стерсомикроскопа с приспособлением для косо́го 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.И.Миронова, В.Г.Мацуга.

## ВВЕДЕНИЕ

При бактериологической диагностике холеры ведущим признаком идентификации выделенной культуры является ее способность агглютинироваться специфическими холерными сыворотками (видовой-0 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 косо́го 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", РИЦИ, 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

1. Полистероловые планшеты для иммунологических реакций с прозрачными крышками.
2. Иглы титровальныя 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 косою освещения.

## II. МЕТОД ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ

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

Взвесь 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 мутности ГИЖКа 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 (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, помоя ее в 96° 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 1 мл.

Пластинку накрывают крышкой и ставят в термостат при  $37^{\circ}\text{C}$  на 2 ч, после чего проводят учет реакции в косо проходящем свете под стереомикроскопом МЭС-1 или МЭС-2.

### III. УЧЕТ РЕАКЦИИ

Реакции оценивают в четырехбалльной системе, просматривая пластинки под микроскопом:

- ++++ (4+) - полная агглютинация - наличие на дне лунки рытлой 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;
- + (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 обоих вариантов не менее чем до 1/2 титра, относятся к серовару Гикосима.

При выполнении исследования возможны сбои в случае недостаточной чистоты микротитровальных планшеток, исчерпанности дунок, а также неполного заполнения микротитровальных игл при титрации сывороток.

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

#### IV. РЕЖИМ РАБОТЫ ПРИ ПОСТАНОВКЕ РЕАКЦИИ АГГЛУТИНАЦИИ 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 0, Инаба, Огава, RO проводится на чистом столе.

Дальнейшую работу осуществляют с соблюдением Инструкции о противозидемическом режиме работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний I-II 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 поднос ставят в термостат при  $37^{\circ}\text{C}$  на 2 ч.

При проведении учета реакции поднос с микротитровальной

плашкеткой переносят на лабораторный стол; плашкетку ставят на стеклянную подставку и просматривают в косо проходящем свете с помощью микроскопа МРС-1 (МСС-2).

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

После учета реакции плашкетку и крышку складывают в ковш, 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. Стеклоплашкетку столика из-под косо освещенного 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 RO - сыворотками и типоспецифическими Oгава и Инчаба 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, пробксанию 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 косоого 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 "Микро" 29 мая 1984 г.

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

Что касается агглютинабельности типоспецифическими сыворотками, то просматривается следующая закономерность: при постановке с сывороткой Инаба в микрометод 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 микрометод; 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 микрометод 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* 21, у которого отмечена неспецифическая реакция агглютинации со всеми сыворотками как в пробирках, так и в планшетах.

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

Вид микроба	: Кол-во:		Агглютинация до диагностического титра с сыворотками			
	: Серо-вары :	: изучает : : штам- : : мов :	: 0 :	: RO :	: Инаба :	: Огава :
<i>V. cholerae cholera</i>	Инаба	13	13/13*	-	13/11	1/1
	Огава	24	24/24	4/1	1/-	24/23
<i>V. cholerae eltor</i>	Инаба	24	23/23	-	21/22	1/2
	Огава	37	37/36	-	-	34/34
<i>V. cholerae</i> не O1 серовара	040	I	-/1	-/1	-	-/1
	041	I	-	-	-	-
	042	I	-	-	-	-
	043	I	-	-	-	-
	044	I	-	-	-	-
	056	I	-	-	-	-
	Не типированный	I	-	-	-	-
Представители сем. Enterobacteriaceae	-	17	1/1	1/2	2/1	1/1

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

Результаты реакции агглютинации при постановке ее микрометодом через 2, 6, 18-20 ч и 2-3 сут оказались 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 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.

#### Л и т е р а т у р а

1. Бененсон А., Аниса Г., Поль А. // Ежл. 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 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. Ротапринт типографии № 6.