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 [x]

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.

I. Объекты и цели исследования

Исследование на наличие столбнячного микроба производится в следующих случаях:

а) при изучении краевой эпидемиологии столбняка с целью установления степени обсемененности Cl *tetani* почвы, пыли, растений и других объектов внешней среды;

б) при проведении плановых санитарно-гигиенических ана-

---

x) 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.М.Булатовой.

gost.e-ecolog.ru

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

I. 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[x]. 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 надписывается.

Для анализа перевязочные средства, образцы кетгута,

---

[x] Применение шпателей для снятия поверхностного слоя почвы затруднено, так как требуется на каждую пробу стерильный 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 ткани из 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 этикетируются, где указывается название материала, фамилия, имя, отчество больного или трупа, дата взятия. Все пробы до исследования должны храниться при температуре не выше 4^{0}.

Ш. 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 pH 7,2-7,4, разлитые по 70 мл во флаконы емкостью 100 мл.

Перед посевом флаконы со средой прогревают на водяной бане при 100^{0} в течение 10 минут для регенерации среды, после чего охлаждают до 45^{0}.

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 раны, тампоны и другие материалы от больных засеваются так же, как указано выше.

Все посевы помещают в термостат при 37^{0}. 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-четырех-суточные посевы испытуемых материалов исследуются методом реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и микроскопированием.

IУ. Материалы и реактивы, необходимые для постановки РНГА

Для постановки РНГА необходимы следующие реактивы и материалы:

1) Реактивы для приготовления буферных растворов:

I/I5 М $Na_2HPO_4 2H_2O$

I/I5 М KH_2PO_4

физиологический раствор

2) Танин

3) Противостолбнячная сыворотка, очищенная и концентрированная методом "Диаферм-3" активностью I000-I500 АЕ в I мл.

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

5) Нормальная кроличья сыворотка.

6) Столбнячный очищенный, концентрированный, но не адсорбированный анатоксин, активностью I50-200 ЕС в I мл.

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

8) Шприц непрерывного действия на I мл.

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

Приготовление буферных растворов

Для приготовления I литра I/I5 М $Na_2HPO_4 2H_2O$ раствора берется II,88 г реактива и добавляется до I литра физиологический раствор.

Для приготовления I литра I/I5 М KH_2PO_4 раствора берется 9,08 г реактива и добавляется до I литра теплый (45^0) физиологический раствор. Из этих исходных растворов готовятся буферные растворы для постановки РНГА.

Буфер с pH 6,4

I/I5 М $Na_2HPO_4 2H_2O$	- 6I,I мл	I00 мл
I/I5 М KH_2PO_4	- 38,9 мл	

Буфер с pH 7,0

I/I5 М $Na_2HPO_4 2H_2O$	- 53,4 мл	240 мл
I/I5 М KH_2PO_4	-I86,6 мл	

Для получения большего количества буферных растворов составные части увеличивают в нужное число раз. Буферные растворы изготовляют заранее, контролируют их pH и сохраняют при 4-10°.

Приготовление раствора танина

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

Сначала готовят исходный раствор танина, который можно сохранять в холодильнике при 4-10° 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 I мг/мл, в результате чего получают разведение танина I:1000. Для получения разведения I:20000 исходный раствор разводят в 20 раз (I 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 сенсибилизации 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:

I) Глюкоза - 2,05 г

2) Лимоннокислый 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 формалинизированные 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 I% нормальной инактивированной при 56° 30 минут кроличьей сывороткой, надосадочную жидкость сливают;

г) осадок суспендируют в 6 мл буферного раствора pH 6,4 с I% нормальной инактивированной кроличьей сывороткой - получается 2,5% взвесь танизированных сенсибилизированных противостолбнячной сывороткой эритроцитов.

Сенсибилизация танизированных [redacted] 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 I% 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 (I: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 I:I0 до I:I0240 [x)] (схема I).

---

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

Схема I

	I:I0	I:20	I:40	I:80	I:I60	I:320	I:640	I:I280	I:2500 и т.д.	Контр.
№ I	0,5 мл исходного разведения	0,5 мл	0,5 мл	и т.д.						0,5 мл
№ 2										0,5 мл
№ 3										0,5 мл
№ 4										0,5 мл
№ 5										0,5 мл
№ 6	0,5 мл столб.анатоксина или токсина	0,5 мл	0,5 мл	и т.д.						0,5 мл
										0,5 мл

В первую лунку каждого из 5 горизонтальных рядов вносят исходные разведения пяти исследуемых культур (№ I-5). В 6-й ряд вносят 0,5 мл столбнячного анатоксина или токсина и разводят также (контроль активности сенсибилизированных эритроцитов). После приготовления разведений испытуемого материала в каждую лунку, включая и контрольные, вносят по 0,I мл взвеси танизированных сенсибилизированных сывороткой эритроцитов. Содержимое лунок тщательно перемешивают путем осторожного встряхивания и доски помещают в термостат на I час при 37°, а затем оставляют при комнатной температуре. Предварительный учет результатов реакции производят через 2-3 часа, окончательный через I8 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 I:20 и выше испытуемого материала, (т.е. - во 2-й и последующих лунках горизонтального ряда доски) при отрицательном контроле в вертикальном I2-м ряду и положительном - в 6-м горизонтальном ряду в разведении не менее I:I280-I:2560 x).

x) 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 I:256С - I:5I20.

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.

Л-93090 от 20/XII-68 года. Тираж 500 экз. Заказ 533

ИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи АМН СССР

gost.e-ecolog.ru