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

gost.e-ecolog.ru

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 0,1 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-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", РИЧИ, 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 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 6-18-часовой агаровой культуры, до концентрации $2 \cdot 10^9$ м.к. в 1 мл, что соответствует 10 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 (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 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 1 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-1 или МБС-2.

Ш. УЧЕТ РЕАКЦИИ

Реакцию оценивают в 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 серовато-го 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 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 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 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 37^0С 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-1 (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 3% раствором хлорамина.

После учета реакции планшетку и крышку складывают в кювет, заливают (3% 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 RO - 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 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

Облиздат типография № 6.

gost.e-ecolog.ru