

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МАКРО- И МИКРОМЕТОДОВ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗОВ И ШИГЕЛЛЕЗОВ В РЕАКЦИИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Д.М. Шарифуллина, Н.З. Шагидуллина, Г.Н. Лапина, Н.Ю. Куряева

*Казанский городской диагностический центр по лабораторной диагностике инфекционных заболеваний (главрач — Н.Н. Хуснутдинов), кафедра микробиологии (зав. — проф. О.К. Поздеев)
Казанской государственной медицинской академии последипломного образования*

При изучении возможности использования одного и того же антигенного эритроцитарного диагностикума для постановки реакции гемагглютинации (РНГА) макро- и микрометодами при различных инфекциях были сопоставлены результаты РНГА, полученные классическим макрометодом и модифицированным микрометодом с использованием микротитратора системы Токачи [4, 5]. Были испытаны эритроцитарные диагностикумы дифтерийный, столбнячный, кластридиозный, стафилококковый, чумной, туляреминый, вирусосоповакцины и кори. Результаты обоих методов совпали. Микрометод позволил сократить расход всех ингредиентов реакции в 6—10 раз, оказался намного производительнее и, как правило, не уступал макрометоду по чувствительности.

В связи с ухудшением экономических условий в нашей стране актуален вопрос об экономии ингредиентов и возможности использования микрометода при постановке РНГА с сальмонеллезными и шигеллезными эритроцитарными диагностикумами, предназначенными для макрометода.

Целью наших исследований было изучение возможности постановки РНГА микрометодом при серодиагностике сальмонеллезов и шигеллезов с антигенными эритроцитарными диагностикумами, разработанными для макрометода. Попутно надо было решить вопрос о необходимости и целесообразности предварительной обработки исследуемых сывороток больных перед постановкой РНГА. Сыворотки больных могут содержать неспецифические гемагглютинины (вещества липоидной природы, нормальные антитела к эритроцитам барана и др.), которые способны негативно повлиять на результаты анализа и давать ложноположительные реакции.

Исследование проводилось в четыре этапа. На первом — определяли активность и специфичность эритроцитарных диагностикумов в присутствии референс-сывороток (диагностических сальмонеллезных и шигеллезных, входящих в комплект эритроцитар-

ных диагностикумов). Реакцию ставили макро- и микрометодами с последующим сопоставлением результатов. Это давало нам возможность одновременно оценивать эффективность макро- и микрометода на заданном положительном сыворотках.

На втором этапе решали вопрос о необходимости обработки сывороток больных с подозрением на сальмонеллез и шигеллез. Обработку производили путем прогревания и истощения сывороток несенсибилизированными эритроцитами для удаления неспецифических гемагглютининов. Результаты исследований обработанных и необработанных сывороток сопоставляли в РНГА, поставленной с помощью макро- и микрометодами.

На третьем этапе исследовали только обработанные сыворотки больных с сопоставлением результатов макро- и микрометодов. На четвертом этапе подобным образом изучали только необработанные сыворотки.

РНГА при микрометодом ставили в полистироловых пластинках с V-образными лунками, в которые вносили по 0,05 мл растворителя (0,85% раствора натрия хлорида, рН 7,2), начиная с первой лунки до шестой. В первую лунку добавляли 0,05 мл исследуемой сыворотки, разведенной 1:50; после тщательного перемешивания получали разведение 1:100, и 0,05 мл этого разведения переносили во вторую лунку. Далее готовили последующие двукратные разведения сыворотки от 1:100 до 1:3200. Во все опытные лунки вносили по 0,025 мл 1% взвеси эритроцитарного антигенного диагностикума. Реакцию контролировали путем испытания эритроцитарного диагностикума на отсутствие спонтанной агглютинации в двух лунках (по 0,05 мл растворителя и 0,025 мл эритроцитарного диагностикума), сывороток больных на отсутствие неспецифических гемагглютининов (в двух лунках готовили разведения сыворотки 1:100 и 1:200 в объеме 0,5 и вносили в них по 0,025 мл 1% взвеси несенсибилизированных эритроцитов), а также диагностической сыворотки, разведен-

ной с 1:100 до титра или удвоенного титра, указанного на этикетке ампулы, для контроля активности и специфичности эритроцитарных диагностикумов.

До недавнего времени эритроцитарные диагностикумы считали специфически активными, если они агглютинировались соответствующими диагностическими сыворотками до 1/2 титра или до одного титра этих сывороток (то есть допускались колебания титра в 2 раза). В настоящее время, например, в "Инструкции по применению эритроцитарного антигенного дифтерийного диагностикума" [3], при определении специфической активности диагностикума допускается колебание от 1/4 до 1 титра референс-сыворотки, то есть колебание титра в 4 раза. В связи с этим диагностические сыворотки мы титровали в 9 лунках с разведением от 1:100 до 1:25600 при титре сыворотки 1:12800. Диагностикумы считали активными и специфичными, если они агглютинировались в диапазоне трех разведений: 1/4 — 1/2 — 1 титр или 1/2 — 1—2 титра. Колебания титра сывороток в 2 и 4 раза лежат в пределах допустимой ошибки.

Для перемешивания ингредиентов пластины постукивали по углам, и реакцию проводили при температурном и временном режимах, указанных в инструкциях. Учет результатов проводили по 4-плюсовой шкале. Титром сыворотки считали то последнее ее разведение, в котором еще наблюдалась гемагглютинация не менее чем на три плюса.

Обработку сыворотки больных для исключения неспецифической гемагглютинации проводили общепринятыми методами (прогреванием на водяной бане при 56°C 30 минут и адсорбцией несенсибилизированными эритроцитами при 4°C 18—20 часов).

На первом этапе исследования активность и специфичность эритроцитарных диагностикумов были определены на 9 диагностических сыворотках. Было поставлено 125 опытов параллельно макро- и микрометодами, из них 69 — с сальмонеллезными эритроцитарными диагностикумами и 56 — с шигеллезными. В целом было проведено 250 исследований. Все эритроцитарные диагностикумы оказались активными и специфичными. Они агглютинировались соответствующими сыворотками до 1/2 титра, до одного титра или удвоенного титра. Только в 5 слу-

чаях эритроцитарные диагностикумы агглютинировались до 1/4 титра (в основном сальмонеллезные) при постановке РНГА микрометодом. Эти диагностикумы агглютинировались в РНГА макрометодом до 1/2 титра сыворотки (табл. 1).

Таким образом, при постановке РНГА с заведомо положительными диагностическими сыворотками микрометодом отклонения от титра в ту или другую сторону регистрировались чаще (12,8±3,0%), чем при макрометоде (3,2±1,5%; P=0,01). При микрометоде число положительных РНГА до удвоенного титра диагностических сывороток было выше (8,8±2,5%), чем при макрометоде (3,2±1,5%; P=0,05). Положительные реакции до 1/4 титра регистрировались только при микрометоде (4,0±1,8%).

Мы не смогли подтвердить выводы, сделанные в "Инструкции по применению псевдотуберкулезного эритроцитарного антигенного диагностикума" [2] о том, что при постановке реакции микрометодом титры сывороток бывают обычно на одно разведение ниже.

При более детальном сопоставлении результатов 125 параллельных опытов, поставленных макро- и микрометодами, полное совпадение титров было получено в 99 опытах (79,2±3,6%). В 16 (12,8±3,0%) опытах титры сывороток были ниже на одно разведение и в 10 (8,0±2,4%) — выше на одно разведение при микрометоде по сравнению с результатами, полученными макрометодом. Эти колебания в 2 раза лежат в пределах допустимой ошибки.

В опытах с диагностическими заведомо положительными сыворотками нам не удалось выявить существенной разницы в колебаниях титров с шигеллезными и сальмонеллезными диагностикумами. Так, при постановке РНГА с шигеллезными антигенами (56 опытов) несовпадения титров при макро- и микрометодах выявлены в 17,9±5,1% случаев, с сальмонеллезными антигенами (69 опытов) — в 23,2±5,1%. Статистически достоверной разницы не было (табл. 2).

Наиболее часто агглютинация до удвоенного титра диагностической сыворотки наблюдалась с сальмонеллезными эритроцитарными диагностикумами как с помощью макро-, так и микрометода (соответственно

Таблица 1

Сравнительная оценка макро- и микрометодов при исследовании заведомо положительных диагностических сывороток в РНГА

Методы постановки РНГА	Всего опытов	Из них положительных РНГА до			
		до 1/2 титра	до 1 титра	до удвоенного титра	до 1/4 титра
Макрометод	125	33 (26,0%)	88 (70,4%)	4 (3,2%)	—
Микрометод	125	33 (26,4%)	76 (60,8%)	11 (8,8%)	5 (4,0%)

Результаты исследования в РНГА заведомо положительных (диагностических) сывороток с различными эритроцитарными диагностикумами макро- и микрометодами

Диагностические сыворотки	Проведено опытов	Титры антител при макро- и микрометодах		Специфическая активность эритроцитарных диагностикумов в присутствии диагностических сывороток							
		полное совпадение развед	титры при микрометоде		при макрометоде			при микрометоде			
			ниже на одно разведение	выше на одно разведение	до 2 титров	до 1 титра	до 1/2 титра	до 2 титров	до 1 титра	до 1/2 титра	до 1/4 титра
К шигеллам:											
Зонне	18	13	4	1	—	16	2	2	12	4	—
Флекснера	18	15	3	—	—	15	3	—	13	4	1
Ньюкестла	20	18	1	1	—	19	1	—	19	1	—
К сальмонеллам											
гр. А	13	9	2	2	4	9	—	5	7	1	—
гр. В	13	12	1	—	—	2	11	—	2	10	1
гр. С1	12	8	2	2	—	3	9	—	4	7	1
гр. С2	5	3	2	—	—	—	5	—	—	3	2
гр. Д	13	10	1	2	—	12	1	2	9	2	—
гр. Е	13	11	—	2	—	12	1	2	10	1	—
Итого	125	99	16	10	4	88	33	11	76	33	5

в $5,8 \pm 4,8\%$ и $13,0 \pm 4,0\%$ по сравнению с шигеллезными (от 0 до $3,5 \pm 2,5\%$). Это можно объяснить, по-видимому, более низкой специфичностью сальмонеллезных диагностикумов или же тем, что диагностические сальмонеллезные сыворотки выпускаются с титрами, превышающими указанные на этикетках ампул.

Итак, в результате исследования заведомо положительных диагностических сальмонеллезных и шигеллезных сывороток можно сделать вывод, что эритроцитарные антигенные сальмонеллезные и шигеллезные диагностикумы, предназначенные для макрометода, можно использовать и для микрометода.

На втором этапе исследования решался вопрос о необходимости предварительной обработки сывороток больных прогреванием и истощением несенсибилизированными эритроцитами перед постановкой РНГА. В последующем обработанную и необработанную сыворотки исследовали макро- и микрометодами. Было поставлено 249 опытов, из них 97 — с сальмонеллезным эритроцитарным диагностикумом и 152 — с шигеллезным. Макрометодом параллельно исследовали обработанные и необработанные сыворотки, полученные у 54 больных с подозрением на сальмонеллез и шигеллез. В необработанных пробах положительными оказались 53 сыворотки ($98,1 \pm 1,8\%$), а в обработанных — 36 ($66,6 \pm 6,9\%$). Следовательно, обработка сывороток снижала процент положительных находок на $31,5\%$ ($P < 0,01$).

Наибольшее снижение наблюдалось в опытах с сальмонеллезными диагностикумами, которые, по нашему мнению, менее специфичны, поэтому истощение сыворо-

ток несенсибилизированными эритроцитами, по-видимому, приводило к удалению из сывороток не только неспецифических, но и специфических гемагглютининов. Так, в 34 необработанных пробах антитела к сальмонеллам были обнаружены в 100% случаев, а в обработанных — только в $61,7 \pm 3,3\%$, то есть наблюдалось снижение титра на $38,3\%$ ($P < 0,001$). Из 20 опытов с шигеллезными диагностикумами в необработанных пробах антитела обнаружены в 19 ($95,0 \pm 5,0\%$), а в обработанных — в 15 ($75,0 \pm 9,9\%$), то есть снижение выявлено на 20% ($P > 0,5$). Микрометодом параллельно исследовали обработанные и необработанные сыворотки от 247 больных, из них в необработанных пробах антитела к сальмонеллам и шигеллам обнаружены в 156 случаях ($63,1 \pm 9,4\%$), а в обработанных — в 112 ($45,3 \pm 10,0\%$). Обработка сыворотки снижала показатели положительных находок на $17,8\%$ ($P > 0,1$). С сальмонеллезными диагностикумами было поставлено 97 опытов. В необработанных сыворотках положительными оказались 48 ($49,4 \pm 5,0\%$) результатов, а в обработанных — 38 ($39,1 \pm 4,9\%$). Таким образом, обработка снижала показатель положительных находок на $10,3\%$ ($P > 0,1$).

С шигеллезными диагностикумами было поставлено 150 опытов, из них в необработанных сыворотках антитела обнаружены в 108 пробах ($72,0 \pm 3,6\%$), а в обработанных — в 74 ($49,0 \pm 4,1\%$). Снижение положительных находок — на $22,7\%$ ($P < 0,001$). Обработка сывороток приводила к более резкому снижению положительных находок при постановке реакции макрометодом ($31,5 \pm 6,3\%$) по сравнению с результатами, полученными микрометодом ($17,8 \pm 2,4\%$; $P = 0,5$). Такое

явление можно объяснить известной закономерностью: чем больше объем сывороток (и антигенов), используемый в исследовании, тем более точными получаются результаты. В этом смысле микрометод, конечно, уступает макрометоду.

Снижение титров антител в обработанных сыворотках обычно объясняют удалением неспецифических гемагглютининов. Однако таковые в наших анализах были обнаружены только в 4 пробах. Следовательно, обработка сывороток приводит к удалению специфических гемагглютининов, что, конечно, недопустимо.

Исходя из изложенного выше, мы пришли к выводу, что при постановке РНГА при серодиагностике сальмонеллезов и шигеллезов исследуемые сыворотки не должны прогреваться и истощаться. Такой обработке нужно подвергать только сыворотки, которые в контроле на неспецифические гемагглютинины дают положительную реакцию. Это заключение согласуется с выводами Ю.Л. Горчакова [1], который определял неспецифические гемагглютинины (гетерофильные антитела) в сыворотках больных ОКЗ.

На третьем этапе исследования оценивали результаты РНГА, полученные макро- и микрометодами только в обработанных сыворотках больных. Всего было исследовано 377 сывороток параллельно макро- и микрометодами. Из них при макрометоде антитела были выявлены в 58 сыворотках ($15,3 \pm 1,8\%$), а при микрометоде — в 68 ($18,0 \pm 1,9\%$). Разницы в показателях не обнаружено ($P \geq 0,1$). Полное совпадение положительных результатов в величине титров при постановке РНГА макро- и микрометодами наблюдалось прежде всего с шигеллезными эритроцитарными диагностикумами (из 47 положительных сывороток полное совпадение титров наблюдалось в 44 случаях, то есть в $93,6 \pm 3,6\%$), а также с сальмонеллезными групповыми диагностикумами (из 20 положительных сывороток полное совпадение титров имело место в 19 случаях, то есть в $95,0 \pm 5,0\%$).

Несколько иные результаты были получены при постановке РНГА с сальмонеллезным комплексным эритроцитарным диагностикумом. Число положительных находок при микрометоде было в 3 раза выше, чем при макрометоде, но все эти несовпадения были обусловлены первым разведением сыворотки (1:100), которое диагностического значения не имеет. Считаем, что решающая роль в серодиагностике сальмонеллезных заболеваний принадлежит групповым диагностикумам, которые дали в наших исследовани-

ях высокий процент совпадения результатов ($95,0 \pm 5,0\%$).

На четвертом этапе определяли результаты РНГА, полученные макро- и микрометодами только в необработанных сыворотках больных. Всего было исследовано 127 сывороток обоими методами: положительные результаты были получены в 61 опыте ($48,0 \pm 4,4\%$), при этом макрометодом — в 54 ($42,5 \pm 4,5\%$), а микрометодом — в 57 ($44,8 \pm 4,4\%$). Статистически достоверной разницы не было. Полное совпадение титров при макро- и микрометодах наблюдалось в 28 случаях ($45,9 \pm 6,4\%$). Несовпадения были зарегистрированы в 33 опытах ($54,1 \pm 6,4\%$), из них на одно разведение — в 26 ($42,6 \pm 6,3\%$), на два — в 7 ($11,5 \pm 4,1\%$). При микрометоде одинаково часто наблюдалось и повышение ($45,9 \pm 8,7\%$), и понижение ($54,5 \pm 8,7\%$) титра по сравнению с результатами макрометода как при сальмонеллезе, так и при шигеллезе. Зарегистрированные несовпадения в титрах на 1—2 разведения лежат в пределах допустимой ошибки.

Несколько лучшие показатели были получены при исследовании сывороток больных на сальмонеллез. Из 23 положительных РНГА полное совпадение титров обнаружено в 14 ($60,9 \pm 10,4\%$) случаях, несовпадения — в 9 ($39,1 \pm 10,4\%$), в том числе на одно разведение — в 8 ($34,8 \pm 10,2\%$), на два — в одном ($4,3 \pm 4,3\%$).

При шигеллезах из 38 положительных РНГА совпадение титров наблюдалось в 14 случаях ($63,2 \pm 7,8\%$), при этом на одно разведение — в 18 случаях ($47,4 \pm 8,1\%$), на 2 — в 6 ($15,8 \pm 5,9\%$). Статистически достоверной разницы в результатах постановки РНГА макро- и микрометодом при сальмонеллезе и шигеллезе не наблюдалось ($P > 0,5$). Все случаи несовпадения макро- и микрометодов были схожи с таковыми при исследовании заведомо положительных диагностических сывороток, то есть были в пределах допустимых колебаний.

ВЫВОДЫ

1. Сальмонеллезные и шигеллезные антигенные эритроцитарные диагностикумы, предназначенные для постановки РНГА макрометодом, можно использовать и для микрометода.

2. Перед постановкой РНГА сыворотки больных с подозрением на сальмонеллез и шигеллез обрабатывать нецелесообразно, так как при этом резко снижаются титры не только неспецифических, но и специфических гемагглютининов. Обработке следует подвергать только такие сыворотки, в конт-

роле которых обнаруживаются неспецифические гемагглютинины.

3. При исследовании в РНГА необработанных сывороток рекомендуется ставить контроль в 3—4 разведениях (в 3—4 лунках), так как в первых двух разведениях (лунках) неспецифическая гемагглютинация может отсутствовать из-за возможного содержания неполных нормальных антител (прозоне), а в последующих — она может проявиться.

4. При постановке РНГА макро- и микрометодами титры антител одних и тех же сывороток (у больных и диагностических) могут колебаться в 2—4 раза, и эти колебания лежат в пределах допустимой ошибки, поэтому для установления серологического диагноза следует исследовать парные сыворотки у больных в динамике заболевания.

Диагностическое значение имеет только нарастание или падение титра антител более чем в 4 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горчаков Ю.Л.//Лаб. дело. — 1991. — № 10. — С. 53—55.
2. Инструкция по применению диагностикума эритроцитарного псевдотуберкулезного антигенного, утвержденная МЗ СССР 3 марта 1987 г.
3. Инструкция по применению диагностикума эритроцитарного дифтерийного антигенного жидкого, утвержденная МЗ и МП Российской Федерации 29 декабря 1989 г.
4. Коницова Р.Е. и др.//Лаб. дело. — 1970. — № 2. — С. 160.
5. Коницова Р.Е., Носков Ф.С., Баяр Г.А. Реакция непрямой гемагглютинации. — Л., 1981.

Поступила 03.12.97.

УДК 616.986.62.7+616.981.136+616.981.25—002.954.2+616.61—002.1511—036.2(470.42)

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ПРИРОДНООЧАГОВЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ В УЛЬЯНОВСКОЙ ОБЛАСТИ

А.А. Нафеев, А.В. Меркулов, Е.Г. Волкова

Ульяновский областной центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора

Резкое ухудшение эпидемиологической ситуации по природноочаговым инфекциям, наблюдающееся в настоящее время, во многом обусловлено политической и экономической нестабильностью в России и странах СНГ, передислокацией войск, массовой миграцией населения, новыми условиями хозяйствования (при которых заболевания домашних животных зоонозами часто остаются нераспознанными и неизвестными), неуправляемым развитием прибыльных промыслов (отлов сусликов и других зверьков с целью получения ценного меха), нарушении стабильности ранее действовавших в рамках бывшего СССР систем эпизоотолого-эпидемиологического надзора и недостаточно активным проведением профилактических, противозооотических и противоэпидемических мероприятий.

Изучение доступной нам литературы [2—5] в связи с ростом заболеваемости туляремии в Ульяновской области показало неравномерность распространения природно-очаговых инфекций на разных территориях, что может быть связано и с различием в интенсивности проводимых исследований местными органами здравоохранения. Полученные сведения имеют первостепенное значение не только для специалистов санитарно-эпидемиологической и ветеринарной служб, но и для практических врачей с целью своевременной постановки правильного диагноза.

Спорадические случаи туляремии имели место в следующих районах: в 1951 г. в Сенгилеевском (3), в 1958 г. в Инзенском (1), в 1990 г. в Кузоватовском (1) и в 1991 г. в Майнском (1), а также в г. Ульяновске в 1995 г. (1) и в 1997 г. (2). Олсуфьев Н.Г. и соавт. [5] считают эти очаги луго-полевыми; инфекция в них, по их мнению, поддерживается в популяциях обыкновенной полевки. В связи с увеличением заболеваемости туляремии в Ульяновской области в последние годы необходимо расширение объема рекогносцировочных исследований: аллергического и серологического обследований населения, проживающего в местности, где были зарегистрированы случаи заболевания, массового обследования беспозвоночных — переносчиков и хранителей туляремийной инфекции, серологического обследования сельскохозяйственных животных и серологического исследования погадок птиц, а также мумифицированных трупов на содержание антигена туляремийного микроба.

Первые случаи ГЛСП на территории Ульяновской области были зарегистрированы в 1956 г. в г. Ульяновске [1], в 1959 г. в Заволжье, Мелекессе, Солдатской Ташле (Теренгульский район), в 1961 г. в Инзенском районе. Заболеваемость носила преимущественно спорадический характер. Значительный подъем заболеваемости ГЛПС с регистрацией групповых случаев был отме-