

учащихся ПТУ, не располагающих обще-  
житиями.

яц Н. А., Крылов Б. А. // Казанский мед. ж.—  
1987. — № 4. — С. 311—313.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дранкин Л. И., Годлевская М. В., За-

Поступила 02.11.87.

# НОВЫЕ МЕТОДЫ И РАЦИОНАЛИЗАТОРСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

УДК 612.118.221.2

## РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ С ДОЗИРОВАННЫМ ЭРИТРОЦИТАРНЫМ ДИАГНОСТИКУМОМ

Ю. Л. Горчаков

Кафедра инфекционных болезней (зав.— проф. Ю. М. Михайлова) Саратовского медицинского института

Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) относится к испытанным средствам серологической диагностики инфекционных болезней. Вместе с тем техника ее постановки, остающаяся практически неизменной на протяжении всего времени использования коммерческих эритроцитарных диагностикумов, не всегда удовлетворяет диагностическим требованиям.

Как известно, основными параметрами любой серологической реакции (объединяемыми понятием «информативность») являются чувствительность, наглядность и специфичность. Применительно к РПГА высокий уровень первых двух характеристик не вызывает никаких сомнений, что же касается специфичности, то есть способности выявлять или исключать гомологичные антитела в более высоком титре, чем гетерологичные, то однозначно оценивать ее степень нельзя. На специфичность РПГА влияют ряд причин и в первую очередь свойства эритроцитарных диагностикумов, которые, благодаря промышленной технологии, можно считать унифицированными и стабильными. Другая причина также не зависит от внутрилабораторных воздействий, хотя варьирует в широких пределах и заключается в выраженности иммунного ответа и мере «чистоты» естественного антигенного раздражителя. К этому необходимо добавить, что, поскольку в природе «чистых» антигенов практически не существует (очищенные, моновалентные, антигенные детерминанты можно получить только в лабораторных условиях), продукция *in vivo* моновалентных, то есть вступающих в реакцию только с одной определенной детерминантой, антител также практически невозможна, в связи с чем возникновение перекрестных реакций с обычными эритроцитарными диагностикумами<sup>1</sup> является, скорее, правилом, чем исключением [2, 4]. Особенно это относится к острым кишечным инфекционным заболеваниям — сальмонеллезу, шигеллезу, эшерихиозу и некоторым другим, возбудители которых имеют общие антигенные детерминанты. Поэтому полу-

чение диагностически значимых результатов РПГА при данных заболеваниях предполагает, во-первых, применение нескольких эритроцитарных диагностикумов, во-вторых, сравнение титров, полученных с ними, и, в-третьих, выделение из них наибольшего, превышающего остальные не менее чем в 4 раза (последнее условие вполне оправдано, так как позволяет исключать ошибку технического характера, например неточность титрования, и подчеркивает неслучайный, достоверный характер разницы между титрами). К сожалению, далеко не всегда в реакциях с родственными эритроцитарными диагностикумами удается добиться подобной дифференцировки антител; более того, нередко наблюдается фактическое равенство титров. Единственным средством, способным повысить специфичность, а следовательно, и информативность РПГА, следует признать изменение техники постановки реакции, а именно: создание условий для увеличения имеющейся разницы между титрами или для ее выявления<sup>2</sup>. Для достижения указанных целей наиболее эффективным оказалось титрование эритроцитарного диагностикума параллельно с титрованием исследуемой сыворотки.

Прежде чем изложить суть предлагаемого способа постановки РПГА, следует кратко охарактеризовать традиционный метод [3].

Исследуемую сыворотку последовательно, с шагом, равным 2, титруют в физиологическом растворе хлорида натрия, к полученным разведениям добавляют эритроцитарный диагностикум в соотношении 1 : 2. Количество титрационных рядов соответствует числу применяемых в РПГА диагностикумов. После инкубации определяют титры РПГА с каждым эритроцитарным диагностикумом и сравнивают их между собой. При использовании одного эритроцитарного диагностикума нет никакой гарантии в том, что полученный титр не может повториться в РПГА с другим, имеющим сходные антигенные детерминанты с первым эритроцитарным диагностикумом, а при использовании всех теоретически возможных по принципу антигенного родства эритроцитарных диагностикумов нельзя быть уверенными, что разница между титрами будет существенной. Поэтому для преодоления указанных трудностей предлагается титровать исследуемую сыворотку не в разбавителе, а в смеси разбавителя с тем эритроцитарным диагностикумом,

<sup>1</sup> Применение антигенных эритроцитарных диагностикумов, основанных на синтетических, то есть в иммунном отношении «чистых» антигенах, не спасает положения, так как природная поливалентность антител все равно сохраняется.

<sup>2</sup> Подобного же правила придерживаются и при оценке достоверности нарастания титра антител в динамике [1].

<sup>3</sup> При первоначальном равенстве титров разницу в одно разведение также можно считать достоверной.

который применяют в данном титрационном ряду, после этого постановка РПГА не отличается от общепринятой.

Добавление эритроцитарного диагностикума в разбавитель сыворотки до ее титрования приводит к тому, что при сохранении титра сыворотки и количества добавляемого после ее титрования эритроцитарного диагностикума каждый объем сыворотки вступает в реакцию с дополнительным объемом эритроцитарного диагностикума. Если последний несет перекрестные антигены, этот избыток диагностикума тормозит реакцию в том титре, в котором она протекала до его добавления в разбавитель (в реакции участвуют антитела только к «перекрестным» антигенам — зона эквивалентности нарушается), а в случае совпадения антигена диагностикума и антител сыворотки титр РПГА остается прежним (все антитела<sup>4</sup>, участвующие в реакции, «свои» — зона эквивалентности сохранена). Изменяя содержание эритроцитарного диагностикума в разбавителе, можно последовательно увеличивать его дозу до тех пор, пока не будет получен желаемый результат.

Техника постановки РПГА с дозированным эритроцитарным диагностикумом заключается в следующем. РПГА ставят микрометодом, отличающимся высокой воспроизводимостью. Используют пластинки микротитратора Такачи с 1:1-образным профилем дна лунок. В качестве разбавителя применяют физиологический (0,85%) раствор хлорида натрия; объем ингредиентов измесяют в каплях капельницы микротитратора.

В соответствии с требованиями предварительного диагноза отбирают группу эритроцитарных диагностикумов. Сначала РПГА ставят по обычной схеме: к разведению (начиная с титра 1:2) исследуемой сывороткой объемом 2 капли добавляют по одной капле эритроцитарного диагностикума. После инкубации в течение 1—2 ч при комнатной температуре отмечают титры РПГА со всеми эритроцитарными диагностикумами и, если достоверной разницы не обнаруживается, ставят повторные серии РПГА.

Условно принимается, что со всеми эритроцитарными диагностикумами получен «одинаковый» титр (на самом деле титры действительно одинаковые или различаются на одно разведение — в таком случае «одинаковым» для всех эритроцитарных диагностикумов титром считается тот, который номинально выше). Этот титр и является главным ориентиром для создания дополнительных доз эритроцитарного диагностикума. Необходимо помнить, что со всеми эритроцитарными диагностикумами проводятся идентичные реакции, имея в виду величину дополнительных доз и порядковые номера соответствующих им лунок — независимо от реальных титров, полученных с каждым эритроцитарным диагностикумом.

При получении дополнительных доз возможно образование «лишних» доз, приходящихся на меньшие или большие по отношению к проверяемым титрам разведения: из них дозы, попадающие на большие разведения, никакого практического значения не имеют, а на меньшие — могут повлиять на величину разницы между титрами. Минимальная значимая дополнительная доза равняется 0,125 капли; в дальнейшем эту

дозу увеличивают в таком порядке, чтобы каждая последующая доза была больше предыдущей на 0,125 капли, иначе можно пропустить дифференциацию титров. При этом следует исходить из того, что в лунке пластиинки микротитратора разведенная сыворотка содержится в объеме 2 капель. Следовательно, вносить эритроцитарный диагностикум в лунку до титрования сыворотки можно только в объеме одной или 2 капель (в первом случае к одной капле эритроцитарного диагностикума добавляют одну каплю разбавителя, во втором — разбавитель в лунку вообще не добавляют; в лунках без эритроцитарного диагностикума содержится по 2 капли физиологического раствора хлорида натрия).

Принцип получения любой дополнительной дозы эритроцитарного диагностикума таков. При внесении эритроцитарного диагностикума в одну лунку после титрования сыворотки в лунку остается половина первоначального объема эритроцитарного диагностикума (например, внесена одна капля, после титрования остается 0,5 капли); в следующих лунках объем диагностикума последовательно уменьшается вдвое. При его внесении в 2 соседние лунки в первой из них после титрования остается половинное количество диагностикума, во второй — полусумма этой половины и эритроцитарного диагностикума, содержащегося во второй лунке. В следующих лунках, как и в предыдущем случае, количество эритроцитарного диагностикума последовательно уменьшается вдвое. Например, требуется создать дополнительную дозу 0,625 капли в лунке с титром 1:128. Для этого в лунку, соответствующую титру 1:32, вносят одну каплю диагностикума, а в лунку, соответствующую титру 1:64, — 2 капли (в исключительном случае дополнительное количество диагностикума не вносят). После титрования сыворотки в первой лунке остается 0,5 капли диагностикума, во второй — 1,25 капли ( $\frac{0,5+2}{2}$ ), в третьей (с титром 1:128) — 0,625 капли ( $\frac{1,25}{2}$ ). Таким же об-

разом рассчитывают и другие варианты, при этом, если необходимо, эритроцитарный диагностикум предварительно вносят в 3, 4 и более лунок.

При постановке опыта с сыворотками, дающими с родственными эритроцитарными диагностикумами близкие, то есть отличающиеся на одно разведение между собой титры, учитывают не только дополнительную дозу, падающую на максимальный титр, но и дополнительную дозу, приходящуюся на предыдущий титр (или титры). При этом технически возможным является образование одновременно 2 или даже 3 дополнительных доз при одномоментном добавлении диагностикума в разбавитель. Например, с двумя эритроцитарными диагностикумами получены титры 1:512 и 1:256; при необходимости можно получить 3, последовательно уменьшающиеся в 2 раза дополнительные дозы, приходящиеся на титры 1:128, 1:256 и 1:512, если в лунку, соответствующую титру 1:128, до титрования сыворотки внести, допустим, одну каплю диагностикума — тогда соответственно указанным титрам будут получены дополнительные дозы, равные 0,5, 0,25 и 0,125 капли.

После внесения в лунки микротитратора эритроцитарного диагностикума и разбавителя в соответствии с задачами исследования титруют ис-

<sup>4</sup> Точнее, избыток антител, который образуется при взаимодействии максимально возможного разведения исследуемой сыворотки только с гомологичным эритроцитарным диагностикумом.

следуемую сыворотку, причем каждому эритроцитарному диагностикуму соответствует отдельный титровальный ряд. Титрование сыворотки производят точно так же, как и в серии РПГА без дополнительных доз эритроцитарных диагностикумов. После титрования сыворотки в каждую лунку вносят по одной капле соответствующего эритроцитарного диагностикума. Инкубация — 1—2 ч при комнатной температуре. Чтение результатов реакции не отличается от обычного. Если повторная серия РПГА не выявляет достоверной разницы или тенденции к дифференцировке титров с различными эритроцитарными диагностикумами, следует провести новые серии РПГА, последовательно увеличивая дополнительные дозы диагностикума. При этом возможно снижение величины всех титров, которым, если конечный результат удовлетворяет требованиям исследования, можно пренебречь.

В процессе отработки метода были исследованы 106 сывороток крови больных тифо-паратифозными заболеваниями (41,5%) и локализованными формами сальмонеллеза и шигеллезом (58,5%). Больные были обследованы в 1—2-й день пребывания в стационаре. Для анализа были отобраны результаты исследования только тех больных, у которых впоследствии диагноз подтвердился бактериологически (см. табл.). В РПГА использовали коммерческие антигенные сальмонеллезные эритроцитарные диагностикумы группы А, В, С<sub>1</sub>, С<sub>2</sub>, Д, Е и шигеллезные эритроцитарные диагностикумы из шигеля Флекснера, Зонне, Ньюкасла, Григорьева—Шиги, Ларджа—Сакса, Штутцера—Шмитца.

Как видно из приведенных данных, применение новой техники постановки РПГА значительно повысило информативность серологического исследования, особенно это было заметно при тифо-паратифозных заболеваниях: из 44 сывороток в 40 невозможно было провести четкую дифференциацию антител с помощью общепринятого метода постановки РПГА (титры одинаковые или близкие друг другу), то есть эффективность его составляла всего 9,1%, при постановке РПГА

## Результаты применения различных способов постановки РПГА

Способы постановки РПГА	Общее количество сывороток		Количество сывороток с достоверной разницей между титрами*		Количество сывороток с одинаковыми или близкими титрами*	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Общепринятый	106	12	11,3±3,1	94	88,7±3,1	
С дозированным эритроцитарным диагностикумом Р	94**	64	68,1±4,8 <0,001	30	31,9±4,8 <0,001	

\* Сравнение проводится между титрами с гомологичными и гетерологичными эритроцитарными диагностикумами; \*\* это количество получено в результате вычитания из 106 сывороток 12, не требующих дальнейшего исследования (см. первую строку таблицы).

с дозированным эритроцитарным диагностикумом — 80% (в 32 сыворотках из 40 было получено достоверное разделение антител по высоте титров).

Таким образом, предлагаемая техника постановки РПГА является высоко эффективной в диагностическом отношении, при этом достоинства микротитрационного метода постановки РПГА — небольшой расход ингредиентов и простота исполнения — полностью сохраняются.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гайдамович С. Я. // Серологические исследования. — В кн.: БМЭ. — Т. 23. — М., Сов. энциклопедия, 1984.

2. Петров Р. В. // Иммунология. — М., Медицина, 1983.

3. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. // Под ред. М. О. Биргера. — М., Медицина 1982.

4. Тимаков В. Д. // Микробиология. — М., Медицина, 1973.

Поступила 02.03.88

УДК 616—078.82

## ИНДИКАТОРНАЯ БУМАГА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕДУКЦИИ БАКТЕРИЯМИ НИТРАТОВ И НИТРИТОВ

Г. И. Рузаль, С. Ю. Абдразякова, Ф. В. Тарнопольская, Т. И. Шиман, А. А. Иргуганова, Н. Х. Хабибуллина

Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии (директор — доц. И. З. Мухутдинов) МЗ РСФСР, городская санитарно-эпидемиологическая станция (главврач — Н. В. Пигалова) г. Казани, городская санитарно-эпидемиологическая станция (главврач — К. М. Ганеева) г. Набережные Челны, I-я инфекционная больница (главврач — Р. К. Ахметов) г. Казани

Для идентификации микроорганизмов, химических и бактериологических исследований все шире внедряются индикаторные бумаги, исключающие применение жидкых дифференциальных сред, различных тест-систем и т. д. Привлекают они простотой, надежностью, длительностью хранения.

В данном сообщении представлены результаты апробации разработанных в Казанском НИИЭМ бумаг для выявления нитрат- и нитрит-редуктаз у представителей различных родов микроорганизмов.

Для смягчения хроматографической бумаги использовали следующие растворы: 1) реактив Гресса—Илоева из жидких компонентов: сульфаниловой кислоты,  $\alpha$ -нафтиламина, уксусной кислоты; 2) 1—2—3—5% водные растворы сухого реактива Гресса производства Ереванского завода объединения «Союзреактив», при этом оптимальным оказался 3% раствор; 3) индикаторную смесь из равных объемов водных растворов  $15,0 \pm 3,0\%$  раствора соляной кислоты и  $1,0 \pm 0,2\%$  раствора риванола. Все растворы готовили непосредственно перед применением неболь-