Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Иммунологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней

Методические указания
МУК 4.2.3533—18

Издание официальное

Москва • 2018

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Иммунологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней

Методические указания
МУК 4.2.3533—18

ББК 53.4
И53

И53 **Иммунологические** методы лабораторной диагностики паразитарных болезней: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018.—47 с.

ISBN 978–5–7508–1639–2

1. Разработаны ИМПиТМ им. Марциновского Первого государственного Московского университета им. И. М. Сеченова (В. П. Сергиев, Е. Н. Морозов, М. Н. Лебедева, О. Г. Полетаева, Н. И. Тумольская, Е. Н. Понировский, Т. В. Продеус, О. П. Зеля, В. Д. Завойкин, К. Ю. Кузнецова, Е. В. Степанова, Е. Н. Жиренкина, Ж. В. Жнакина), ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора (Т. И. Твердохлебова, Л. А. Ермакова, О. С. Думбадзе, Л. В. Шишканова), Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Т. М. Гузеева), ФБУЗ «Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (Т. Г. Сыскова, М. М. Асланова), ФБУН «Тюменский НИИ краевой и инфекционной патологии» Роспотребнадзора (Т. Ф. Степанова, Т. В. Постникова, К. Б. Степанова), ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России (Т. Н. Константинова), ФБУЗ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (А. Л. Гинзбург, Д. Б. Гончаров), ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (О. Ю. Старостина).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 24 ноября 2017 г. № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 15 февраля 2018 г.

4. Введены взамен МУ 3.2.1173—02 «Серологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней».

ББК 53.4

ISBN 978–5–7508–1639–2

© Роспотребнадзор, 2018

Содержание

I. Область применения 4
II. Отбор проб, хранение и транспортирование биологического материала для иммунологических исследований 4
III. Иммунологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней 7
IV. Оценка результатов реакции иммуноферментного анализа 13
V. Реакция непрямой иммунофлюоресценции 15
VI. Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации 16
VII. Иммунохроматографический анализ 18
VIII. Регистрация и учет результатов иммунологических исследований 18
IX. Требования к проведению иммунологических исследований 18
X. Контроль качества. Общие требования 20
XI. Общая характеристика паразитозов и порядок проведения иммунологических исследований при диагностике паразитарных болезней 21
Приложение 1. Журнал регистрации и учета иммунологических исследований на паразитарные болезни 45
Приложение 2. Протокол проведения иммунологических исследований 47

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
15 февраля 2018 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Иммунологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней

Методические указания МУК 4.2.3533—18

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания предназначены для специалистов паразитологических, микробиологических лабораторий Роспотребнадзора, медицинских организаций, а также научно-исследовательских институтов (структурных подразделений), осуществляющих лабораторную диагностику паразитарных болезней, а также могут быть использованы организациями, занимающимися лабораторной диагностикой паразитарных болезней, и носят рекомендательный характер.

1.2. В методических указаниях изложен порядок применения методов иммунологической диагностики паразитарных болезней и отбора проб биологического материала.

II. Отбор проб, хранение и транспортирование биологического материала для иммунологических исследований

2.1. Отбор проб, хранение и транспортирование проб. Общие положения

2.1.1. При иммунологических исследованиях используют биологический материал от людей: кровь, спинномозговую жидкость, кал.

2.1.2. Взятие крови для серологических исследований проводят в утренние часы после 12-часового ночного голодания. Накануне взятия проб крови пациент должен воздержаться от физических нагрузок,

приема алкоголя и лекарств. Оптимальным временем для взятия проб крови на лабораторные исследования является промежуток с 7 до 10 часов утра.

2.1.3. Взятие спинномозговой жидкости (СМЖ) не требует определенных временных условий.

2.1.4. Кал для исследований доставляется в лабораторию в день дефекации. Допускается хранение кала в течение ночи при температуре от 2 до 8 ℃. Следует избегать примесей мочи, выделений из половых органов.

2.2. Отбор, хранение и транспортирование проб крови

2.2.1. Взятие проб крови на исследование проводит медицинский персонал в процедурном кабинете медицинских организаций.

2.2.2. Для проведения серологических исследований берется венозная кровь в объеме 3—5 мл или капиллярная кровь в объеме не менее 1 мл в стеклянные, пластиковые или вакуумные пробирки (вакутейнеры), предназначенные для биохимических и серологических исследований.

При проведении иммунологических исследований на паразитарные болезни используют пробирки без наполнителей и активаторов свертывания крови!

2.2.3. Пробирки этикетируют в соответствии с данными направления на обследование (ФИО, возраст пациента, предварительный диагноз), проставляют дату взятия и номер анализа или используют штрихкодирование пробирки.

2.2.4. При транспортировании пробирки с кровью должны быть плотно закрыты, прочно установлены в штативы в вертикальном положении, чтобы предотвратить их встряхивание или опрокидывание, установлены вдали от нагревательных приборов и защищены от воздействия яркого солнечного света. Пробирки с кровью для серологических анализов транспортируют в термоконтейнерах с надписью: «пробы крови для лабораторных исследований». В термоконтейнере должна поддерживаться температура от 4 до 8 °С. Пробы крови от больного с установленным инфекционным диагнозом помещают в дополнительный вторичный контейнер, затем – в термоконтейнер с надписью: «пробы с инфицированным материалом» в соответствии с действующими нормативными документами. В журнале учета лабораторных исследований регистрируют время доставки проб в лабораторию.

2.2.5. Центрифугирование проб крови проводят после полного свертывания крови в пробирках. Время свертывания зависит от типа вакуумных пробирок и составляет 1—2 часа. Перед проведением цен-

трифугирования проверяют, все ли пробирки, стаканы для них, вкладыши одинаковы по весу, форме. Для уравновешивания ротора при центрифугировании подбирают одинаковые пары пробирок и каждую из них устанавливают в симметричные противоположные гнезда ротора центрифуги. При непарном количестве проб можно использовать дополнительную пробирку с водой нужного объема. Пробирки центрифугируют в течение 10—15 минут при 1 000—1 500 об./мин. При использовании вакуумных пробирок рекомендованная скорость центрифугирования – 3 500 об./мин.

После центрифугирования образцы сыворотки переносят в микропробирки. Микропробирки с образцами сыворотки маркируют в соответствии с этикеткой пробирки.

2.2.6. Сроки хранения пробы сыворотки при температуре холодильника (4 °С) – не более 4 дней. Хранение проб сывороток от 7 дней до 1 года осуществляют в замороженном виде при температуре не выше минус 18 °С. Длительное хранение проб (более года) осуществляется при температуре не выше минус 40 °С. Длительное хранение пробы сыворотки приводит к частичной потере активности антител (АТ), особенно иммуноглобулинов класса М (IgM), за счет агрегации неспецифических иммуноглобулинов, что приводит к получению ложноположительных результатов.

2.2.7. Транспортирование замороженных проб сывороток должно происходить при температурных условиях, не допускающих размораживания, с использованием сумки-холодильника, термоконтейнера или термоса со льдом, допускается использовать сухой лед.

2.2.8. Сыворотку перед исследованием необходимо полностью разморозить и тщательно перемешать во избежание нарушения концентрации антител.

2.3. Отбор проб, хранение и транспортирование проб спинномозговой жидкости

2.3.1. Пробы СМЖ собирают в любое время. Исследование проводят в день доставки материала. При доставке образцов СМЖ в лабораторию в течение 1 ч – пробы не охлаждают, до трех часов – пробы СМЖ следует хранить на льду, но не замораживать. Транспортирование следует осуществлять в термоконтейнере при температуре 4 °С.

2.4. Отбор проб, хранение и транспортирование проб кала

2.4.1. Пробы кала (нативный, без консерванта) для исследования должны быть собраны в чистую сухую стеклянную (пластиковую) посуду с широкой горловиной.

2.4.2. Исследования проводят в день доставки материала в лабораторию или пробы замораживают. Пробы хранят при минус 18 °С до двух недель. Перед проведением исследования образцы необходимо разморозить.

III. Иммунологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней

3.1. Иммунологические методы

3.1.1. Иммунологические методы диагностики гельминтозов и протозоозов относятся к косвенным методам, когда выявляются не сами паразиты, а их растворимые антигены (АГ) или специфические антитела, которые вырабатываются в организме инвазированного человека в ответ на поступление антигенов паразитов.

3.1.2. Иммунологические методы являются дополняющими к комплексу паразитологических, клинических и лабораторно-инструментальных методов диагностики паразитарных болезней. В диагностике гельминтозов и протозоозов применяются как методы определения специфических антител, так и методы определения антигенов возбудителей.

Эффективность иммунологических методов исследования зависит от стадии инвазии, количества паразитов в организме, состояния иммунной системы инвазированного человека, особенностей организма возбудителя и места его локализации, а также от иммунохимических характеристик диагностического набора, условий хранения и сроков годности реагентов.

Одним из проявлений иммунного ответа является выработка антител. В ответ на поступление антигенов гельминтов в организме человека вырабатываются антитела всех известных классов. Однако использование иммунологических методов выявления антител при паразитарных инвазиях имеет ряд естественных ограничений: генетическая неоднородность популяционного иммунитета, перекрестные реакции с антигенами человека и возбудителя, наличие у паразитов механизмов защиты от иммунного ответа хозяина (молекулярная мимикрия, антигенная мозаичность, иммуносупрессивное действие). Все это обусловливает возможность регистрации ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Получение ложноположительных результатов происходит при наличии в крови пациента так называемых «перекрестно-реагирующих» антител, сходных по своим иммунохимическим свойствам со специфическими антителами (при синдроме поликлональной активации).

Ложноотрицательный результат может быть получен при проведении исследования пробы крови, содержащей низкий уровень антител, например: очень ранняя стадия инвазии, когда уровень специфических антител еще ниже порогового уровня их выявления; при хронической стадии инвазии описторхидами, если не было повторных заражений; при низкой интенсивности инвазии; при легочной локализации эхинококковой кисты, при обызвествлении ее оболочек; на фоне иммунодефицитных состояний вследствие сопутствующих хронических заболеваний или индуцированных приемом медикаментов (антибиотиков, глюкокортикостероидов, химиопрепаратов); при наличии в крови специфических антител и циркулирующих антигенов в эквивалентных количествах, что приводит к их связыванию в иммунные комплексы, не выявляющиеся диагностическим набором; при отсутствии в диагностическом наборе эпитопов антигена на имеющиеся в крови специфические антитела.

3.1.3. Иммунологические методы определения антител к антигенам гельминтов и простейших широко используются для массового обследования населения конкретной территории, для оценки уровня эндемии в отношении какого-то паразита, для выявления групп лиц, находящихся в условиях высокого риска заражения (профессиональных, возрастных и т. д.), для оценки эффективности проводимых оздоровительных мероприятий, а также как вспомогательные методы при постановке диагноза паразитарного заболевания.

3.1.4. Иммунологические методы выявления антител и антигенов гельминтов и простейших: иммуноферментный анализ (ИФА) (иммуноферментный анализ антител, иммуноферментный анализ антигенов, иммуноферментное определение индекса авидности (ИА) антител класса G, иммунный блоттинг), иммунохроматографический анализ (ИХА), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ).

Иммунологические исследования проводят с использованием наборов реагентов, зарегистрированных к применению на территории Российской Федерации в установленном законодательством порядке согласно инструкциям по их применению.

3.2. Иммуноферментный анализ

3.2.1. Реакция ИФА основана на специфическом взаимодействии антигена и антител с предварительной иммобилизацией (фиксацией) одного из компонентов реакции (антигена или антител) на твердофазном носителе в лунках полистироловых планшетов, стрипов и выявле-

нии образовавшегося комплекса «антиген–антитело» посредством ферментной метки (конъюгата).

3.2.2. Выявление образовавшегося комплекса осуществляется по измерению интенсивности окраски – оптической плотности (ОП) субстратной смеси, содержащей вещество, с которым реагирует фермент, индикатор, изменяющий цвет под действием продуктов реакции «фермент–субстрат». Определяется ОП с помощью сканирующего спектрофотометра, оснащенного светофильтрами, с определенной длиной волны света: основная – 450 нм, референсная – 620 или 680 нм. Измерение проводится в единицах оптической плотности (ЕОП).

3.2.3. При динамическом наблюдении больного с целью подтверждения диагноза и контроля эффективности лечения следует проводить повторные исследования ИФА, используя метод постановки парных сывороток крови от одного и того же больного, при котором одновременно исследуют два образца сыворотки крови: первый образец, сохраненный после первичного обследования (хранится в замороженном виде), второй образец – взятый в день повторного исследования.

3.2.4. Набор реагентов для ИФА включает: иммуносорбент – твердофазный носитель с адсорбированным на нем активным ингредиентом системы (антигеном, моноклональными или поликлональными антителами); контрольные тест-сыворотки: диагностические, отрицательные, положительные, для контроля хода реакции и оценки результатов анализа; растворы конъюгатов; растворы хромогена и стоп-реагента; разводящие и отмывающие растворы.

3.3. Иммуноферментный анализ антител к антигенам паразитов

3.3.1. **Принцип метода.** Метод определения антител (иммуноглобулинов) к антигенам гельминтов и простейших представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ и основан на связывании специфических антител с иммобилизованными в лунках стрипов антигенами паразитов и образовании комплекса «антиген–антитело» на поверхности лунок. Несвязавшиеся в ходе реакции компоненты сыворотки удаляют. В лунки планшета добавляют конъюгат моноклональных антител против иммуноглобулинов классов IgA, IgM, IgG человека с пероксидазой хрена: в результате происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс. Комплекс «антиген–антитело–конъюгат» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина (ТМБ). Затем в реакцию вносят стоп-реагент и измеряют оптическую плотность растворов в лунках: на основной длине волны – 450 нм, при референсной длине волны – 620—655 нм. Интенсивность окрашивания пропорцио-

нальна концентрации иммуноглобулинов к антигенам паразитов в анализируемом образце сыворотки. Выявление антител класса М свидетельствует о недавнем заражении, присутствие в анализируемой пробе специфических IgG при отсутствии IgM характерно для хронических форм инвазий.

3.3.2. В настоящее время на рынке представлены зарегистрированные ИФА-тест-системы для определения антител разных классов к антигенам аскарид, анизакид, токсокар, трихинелл, описторхисов, клонорхисов, эхинококков, стронгилоидеса, лямблий, токсоплазм.

3.4. Иммуноферментное определение концентрации аллергенспецифических IgE к антигенам паразитов

3.4.1. Метод является разновидностью иммуноферментного анализа антител к антигенам паразитов.

Принцип метода. Метод основан на применении твердофазного иммуноферментного анализа и проводится в три стадии.

3.4.2. На первой стадии калибровочные образцы с известной концентрацией IgE, контрольный и исследуемые образцы инкубируют в лунках стрипированного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами (МКАТ) к иммуноглобулину класса IgE человека. Затем планшет отмывают.

3.4.3. На второй стадии в лунки с калибровочными образцами добавляют биотинилированные антитела к IgE (конъюгат 1), а в лунки с контрольным и исследуемыми образцами вносят соответствующие биотинилированные аллергены. После инкубации планшет отмывают и в лунки планшета добавляют конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (конъюгат 2).

3.4.4. На третьей стадии конъюгат 2 связывается с биотинилированным агентом (с аллергеном или с конъюгатом 1). Количество связавшегося конъюгата 2 пропорционально концентрации аллергенспецифического IgE в контрольном и в исследуемых образцах, или общего IgE в калибраторах. Иммунный комплекс «иммобилизованные МКАТ–IgE–аллерген–конъюгат» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. В реакцию вносят стоп-реагент. Результаты учитываются фотометрически. Степень окрашивания раствора в лунках с исследуемыми образцами пропорциональна концентрации аллергенспецифических IgE.

Метод применяется для повышения эффективности иммунологической диагностики.

3.5. Иммуноферментное определение индекса авидности антител класса IgG к антигенам паразитов

3.5.1. Определение ИА иммуноглобулинов класса G к антигенам паразитов в сыворотке крови человека может быть использовано для подтверждения диагноза острой инфекции, уточнения сроков инфицирования и дифференцирования острой и хронической стадии инвазии. Авидность характеризует степень прочности связи специфических антител с соответствующими антигенами. При формировании иммунного ответа вначале образуются IgG с низкой авидностью, по мере хронизации инвазии прочность связи, и, соответственно, индекс авидности, увеличивается.

3.5.2. **Принцип метода.** Метод определения основан на применении трехстадийного твердофазного иммуноферментного анализа с использованием антигена паразита, белок-диссоциирующего агента и моноклональных антител против иммуноглобулина класса IgG человека. На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы сыворотки инкубируют в лунках параллельных рядов, на которых иммобилизованы антигены паразитов. Содержащиеся в сыворотке крови специфические к паразитам антитела связываются с антигеном и формируют комплекс «антиген–антитело». На второй стадии, после внесения белок-диссоциирующего агента в один из параллельных рядов, происходит диссоциация комплекса «антиген–антитело», включающий IgG с более низкими константами связывания (низкой авидностью). На третьей стадии связавшиеся антитела взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител против IgG человека с пероксидазой хрена. Комплекс «антиген–антитело–конъюгат» выявляют внесением тетраметилбензидина. Затем в реакцию вносят раствор стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках: на основной длине волны – 450 нм, при референсной длине волны – 620—655 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству связанных в комплекс IgG антигенов паразитов. Рассчитывается ИА как отношение оптической плотности, полученной в лунках в присутствии диссоциирующего агента, к оптической плотности, полученной при анализе без диссоциирующего агента, и выражается в процентах. При обнаружении низкоавидных IgG предполагают острую стадию первичного заражения.

3.5.3. В настоящее время на рынке представлена ИФА-тест-система для определения ИА к IgG, специфичным к антигенам токсоплазм.

3.6. Иммуноферментный анализ циркулирующих иммунных комплексов, включающих антиген паразита

3.6.1. **Принцип метода.** Метод определения циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) к антигенам паразитов представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ, в ходе которого при взаимодействии исследуемых образцов сывороток крови в лунках стрипов с иммобилизованными антителами к антигенам паразитов происходит связывание специфических иммунокомплексов и образование комплекса «антитело-ЦИК» на поверхности лунок. После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки в лунки планшета добавляют конъюгат пероксидазы хрена с иммуноглобулинами против IgG человека, происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс. Иммунный комплекс выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. В реакцию вносят стоп-реагент и измеряют оптическую плотность растворов в лунках: при длине волны – 450 нм, референсной длине волны – 620—655 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации циркулирующих иммунокомплексов, содержащих антигены паразитов, в анализируемом образце сыворотки. Метод применяется для повышения эффективности иммунологической диагностики.

3.6.2. В настоящее время на рынке представлена ИФА-тест-система для определения ЦИК, включающих антигены описторхисов.

3.7. Иммуноферментный анализ антигенов паразитов

3.7.1. **Принцип метода** заключается во взаимодействии иммобилизованных в лунках полистироловых планшетов моноклональных антител со специфическими паразитарными антигенами. Фиксированные на поверхности лунок антитела инкубируют с анализируемой пробой. Специфические паразитарные антигены, содержащиеся в пробе, образуют на поверхности лунок комплекс «антитело–антиген». Полученный комплекс «антитело–антиген» выявляется с помощью иммуноферментного конъюгата. При добавлении субстратного раствора и хромогена развивается цветная реакция. Если в качестве хромогена используется тетраметилбензидин (ТМБ), то измерение оптической плотности растворов в лунках проводят на основной длине волны – 450 нм, при референсной длине волны – 620—655 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации искомого антигена в анализируемой пробе.

3.7.2. В настоящее время на рынке представлены зарегистрированные ИФА-тест-системы для определения антигенов лямблий, криптоспоридий, энтамебы в фекальных образцах.

3.8. Метод иммунного блоттинга

3.8.1. Метод является модификацией ИФА, в котором антигены нанесены на нитроцеллюлозную мембрану (стрип). Это высокоспецифичный и высокочувствительный референсный метод, подтверждающий диагноз для пациентов с положительными или неопределенными результатами анализов, полученными в других методах.

3.8.2. **Принцип метода**. В основе теста лежит метод непрямого иммуноферментного анализа на нитроцеллюлозной мембране, на которую методом электропереноса нанесены основные индивидуальные белки искомого возбудителя, полученные при электрофоретическом разделении антигенов. Специфические антитела (при наличии их в исследуемой сыворотке крови) связываются с индивидуальными белками паразита, сорбированными на мембране (стрипе). Полученные иммунные комплексы затем связываются с конъюгатом, ферментативная активность которого приводит к появлению окрашенных полос на стрипе в зонах локализации соответствующих индивидуальных белков паразита. Расположение окрашенных полос на стрипе соответствует молекулярным массам индивидуальных белков.

3.8.3. В настоящее время на рынке представлена тест-система для диагностики эхинококкоза методом иммуноблота.

IV. Оценка результатов реакции иммуноферментного анализа

4.1. Оценку результатов ИФА проводят в том случае, если окраска субстратной смеси в лунках с контрольными образцами соответствует параметрам, указанным в инструкции по применению набора реагентов.

4.2. Исследуемую пробу считают положительной, если значение ее ОП в диагностическом разведении равно или превышает значение ОП диагностического уровня, указанного в инструкции по применению набора реагентов.

4.3. Учет результатов ИФА осуществляют в соответствии с инструкцией по применению тест-системы, в которой даны расчетные формулы для определения положительных и отрицательных результатов исследования.

4.4. При количественном учете результатов исследования к набору прилагается диагностический образец (образцы) с известным количеством антител (или антигенов) и по прилагаемой формуле или по калибровочной кривой вычисляется количество антител (или антигена) в испытуемом образце.

Ниже приведены варианты учета результатов.

4.5. Определение титра антител в анализируемой сыворотке крови.

4.5.1. За титр антител принимают наибольшее разведение испытуемой сыворотки, при котором ее значение ОП равно или превышает значение ОП диагностического уровня. Вычисление диагностического уровня (критическое значение ОП) проводят с помощью формулы и коэффициентов, рассчитанных для каждой серии диагностических наборов и указанных в инструкции к тест-системе, например:

Образцы	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1 600	1/3 200	1/6 400	1/12 800
К+	1,25							
К–	0,09							
Исп.	0,97	0,53	0,25	0,14	0,10	0,08	0,05	0,05

ОП диагностического уровня определяем по формуле:

$$ОП_{ду} = ОПК- + 0,14, \text{ где}$$

$ОП_{ду}$ – диагностическое значение оптической плотности;

ОПК– – оптическая плотность отрицательного контрольного образца сыворотки;

0,14 – коэффициент единиц оптической плотности, установленный производителем тест-системы.

В приведенном примере ОП = 0,09 + 0,14 = 0,23.

В этом случае титр антител в испытуемой сыворотке равен 1 : 400.

4.6. Определение относительной концентрации АТ в антительных единицах (АЕ). Вычисления проводят по следующей формуле:

$$АЕ = (ОП_{исп.} - ОП_{ду}) \div (ОПК+ - ОП_{ду}) \cdot 100, \text{ где}$$

$ОП_{исп.}$ – оптическая плотность испытуемого образца сыворотки;

ОПК+ – оптическая плотность контрольного образца сыворотки.

4.6.1. В качестве стандартного образца в данной методике определения концентрации антител в АЕ используют контрольный положительный образец сыворотки, входящий в набор реагентов для исследования.

4.7. **Определение концентрации АТ по образцу (образцам) с известным количеством АТ.** Для количественного определения концентрации антител в набор реагентов в зависимости от комплектации включены 1 или 4—6 контрольных образцов с известным количеством антител. По расчетной формуле или калибровочному графику определяют количество антител в испытуемом образце.

4.8. Определение концентрации АТ по коэффициенту позитивности КП (или индексу пробы ИП). Коэффициент позитивности высчитывают по формуле:

$$КП_{обр.} = ОП_{обр.} \div ОП_{ду}, \text{ где}$$

$КП_{обр.}$ – коэффициент позитивности исследуемого образца;

$ОП_{обр.}$ – средняя оптическая плотность исследуемого образца;

$ОП_{ду}$ – диагностический уровень оптической плотности (ОП), значение которого определяется в соответствии с инструкцией по применению набора.

Результат анализа считается положительным, если $КП_{обр.}$ больше или равен единице. Значения $КП_{обр.}$, соответствующие отрицательному или сомнительному (неопределенному) результату, указываются в инструкции производителя.

V. Реакция непрямой иммунофлюоресценции

5.1. **Принцип метода.** Иммунохимический метод основан на образовании иммунного комплекса «антиген–антитело», для выявления которого используется в качестве метки флуоресцентный краситель. В результате каждый образовавшийся комплекс «антиген–антитело» несет на себе молекулу красителя, свечение которого регистрируется с помощью люминесцентного микроскопа.

5.2. Реакцию непрямой иммунофлюоресценции проводят непосредственно на предметном стекле с фиксированными корпускулярными антигенами (взвесь простейших, срезы тканей паразита).

Выполняться РНИФ может в виде качественного и полуколичественного анализов, поскольку на одно стекло могут быть нанесены разные разведения исследуемой сыворотки.

Учет результатов РНИФ проводят при микроскопии препаратов в люминесцентном микроскопе.

5.3. Для проведения РНИФ необходимы: известный антигенный препарат (специально размеченные предметные стекла с фиксированным корпускулярным антигеном); контрольные положительная и отрицательная сыворотки к известному антигену; люминесцирующая антивидовая сыворотка (конъюгат) и другие реагенты.

5.4. Ход исследования:

– подготовка рабочих растворов;

– титрование испытуемых сывороток и контрольных образцов сыворотки;

– нанесение оттитрованных испытуемых и контрольных образцов сывороток на специально размеченные предметные стекла с антигеном;

– инкубация антигенных препаратов с образцами сывороток во влажной камере в соответствии с параметрами условий инкубации инструкции по применению набора реагентов;

– удаление непрореагировавших компонентов сыворотки путем трехкратного отмывания препаратов в растворе фосфатно-солевого буфера (ФСБ);

– высушивание препаратов при комнатной температуре;

– нанесение разведенного раствора люминесцирующей антисыворотки (конъюгата) на стекла с антигеном;

– инкубация препаратов во влажной камере при комнатной температуре;

– удаление непрореагировавших компонентов сыворотки путем трехкратного отмывания препаратов в растворе фосфатно-солевого буфера;

– высушивание препаратов при комнатной температуре;

– нанесение забуференного глицерина на антигенные препараты;

– микроскопирование препаратов под покровным стеклом в сине-фиолетовой части спектра (435 нм) люминесцентного микроскопа.

Результаты реакции оцениваются в соответствии с прилагаемой инструкцией.

5.5. В настоящее время на рынке присутствуют наборы для диагностики лейшманиоза, эхинококкоза и других паразитозов методом РНИФ.

VI. Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации

6.1. **Принцип метода** основан на способности обработанных специальными реагентами эритроцитов адсорбировать на своей поверхности антиген и при контакте со специфическими антителами склеиваться и образовывать осадок, видимый невооруженным глазом. РНГА является полуколичественным методом, учет результатов проводится визуально.

Диагностический набор содержит: эритроциты, сенсибилизированные специфическим антигеном (Д+), обработанные эритроциты без антигена (Д–), положительный контрольный образец (К+), отрицательный контрольный образец (К), реагент для приготовления раствора для разведения сывороток.

6.2. **Ход исследования**:

1) реакция непрямой гемагглютинации выполняется строго в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору реагентов, и включает следующие этапы:

– подготовка рабочих растворов, необходимых для проведения анализа;

– подготовка испытуемых сывороток и контрольных образцов сывороток;

– внесение в лунки планшета испытуемых и контрольных образцов;

– внесение диагностикума (Д+) и эритроцитов без антигена (Д–);

2) инкубация препаратов в соответствии с условиями в инструкции по применению.

6.3. **Оценка результатов реакции.** Результаты исследования учитывают в титрах и по интенсивности реакции, выраженной в крестах. При оценке результатов анализа по 4-крестовой системе учитывается характер осадка на дне лунок:

«++++» – резко интенсивная реакция. Полная агглютинация эритроцитов, которые осели на дно и стенки лунки в виде «зонтика»;

«+++» – интенсивная реакция. Практически полная агглютинация эритроцитов, которые осели на дно и стенки лунки в виде «зонтика», в центре «зонтика» имеется слабо выраженное оседание эритроцитов в виде «точки» или «пуговки»;

«++» – реакция средней интенсивности. Осели в виде «зонтика» 50 % эритроцитов, остальные эритроциты образовали в центре лунки осадок в виде «точки» или «пуговки»;

«+» – реакция слабой интенсивности. Осели в виде «точки» или «пуговки» 75 % эритроцитов – слабо выраженная агглютинация эритроцитов.

Реакция отрицательная: отсутствие агглютинации эритроцитов, осадок сформирован в виде «точки» или «пуговки» с ровными, четкими краями.

Учет проводится при соответствующих показателях контролей:

«Д+» – не образуют спонтанной агглютинации в отсутствии сыворотки;

«сК–» – Д+ не агглютинируют в разведении выше диагностического титра;

«сК+» – Д+ агглютинируют в соответствующем титре (согласно инструкции по прилагаемой к набору реагентов для РНГА);

«Д–» – не образуют спонтанной агглютинации в отсутствии сыворотки, а также с К+ и испытуемыми сыворотками.

Конечным титром реакции испытуемого образца сыворотки считают максимальное разведение, при котором наблюдается четкая агглютинация не менее чем на 2 или 3 креста в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов. Диагностические титры реакции с эритроцитарными диагностикумами указаны в инструкции по применению.

VII. Иммунохроматографический анализ

7.1. Иммунохимический метод, основанный на принципе тонкослойной хроматографии (далее – ИХА) относится к экспресс-методам и позволяет проводить предварительные исследования в «полевых» условиях.

Принцип метода. На нитроцеллюлозной полоске теста в определенных местах иммобилизованы специфические антитела, антивидовые антитела и меченый конъюгат. Биологическая проба наносится на мембрану (нитроцеллюлозную полоску) и, смешиваясь с сигнальным реактивом (меченый конъюгат), мигрирует по ее длине. Положительная реакция развивается в течение нескольких минут и проявляется в виде линии в том месте, где на мембране были нанесены антитела. Наличие видимых линий в тестовых и контрольных местах означает положительную реакцию, появление только контрольной линии свидетельствует об отрицательном результате. Большинство методик ИХА не требуют дополнительных приспособлений и могут храниться и транспортироваться без холодильного оборудования.

При постановке метода обязательно должна быть видна контрольная полоса. Если контрольная полоса не появляется при повторном исследовании, то тест-система непригодна к использованию.

7.2. В настоящее время на рынке представлены диагностичсские наборы на основе метода ИХА для определения антигенов лямблий, лейшманий, криптоспоридий, малярии, а также антител к эхинококку, малярии.

VIII. Регистрация и учет результатов иммунологических исследований

8.1. Результаты иммунологических исследований регистрируют в журналах учета и регистрации в бумажной и электронной версии.

Результаты ИФА дополнительно учитываются в протоколах исследований, которые включают распечатанные данные спектрофотометров по каждому исследованию.

Образцы журнала учета и протоколов исследований рекомендованы в приложениях 1 и 2.

IX. Требования к проведению иммунологических исследований

9.1. При проведении иммунологических исследований применяют наборы реагентов, прошедших государственную регистрацию на территории Российской Федерации в установленном порядке.

9.2. Перед проведением иммунологических исследований необходимо ознакомиться с инструкцией по применению, в которой определен порядок проведения аналитической процедуры. Диагностические наборы реагентов одного типа, выпущенные разными предприятиями, могут иметь свои особенности постановки исследований.

9.3. ***Не допускается смешивание реактивов из разных серий наборов!***

Необходимо строго соблюдать условия хранения и сроки годности наборов реагентов, указанных в паспорте.

Не допускается использование наборов с истекшими сроками годности!

9.4. Перед исследованием наборы реагентов необходимо выложить из холодильника и довести их температуру от 20 до 25 °С (температуры окружающей среды).

9.5. Строго соблюдать временной и температурный режим постановки ИФА: реакция связывания антител с антигенами начинается сразу по ходу постановки анализа, в связи с чем необходимо рассчитать время между внесением первого и последующих образцов сывороток на планшет таким образом, чтобы предусмотреть возможные изменения оптической плотности испытуемых образцов и соответственно результатов исследования.

9.6. Испытуемые образцы сыворотки, дающие оптическую плотность в ближайшем к «серой» зоне диапазоне оптических плотностей, подлежат повторному исследованию. К «серой» зоне относят значения оптической плотности образцов, расцененных как «сомнительные» (или «неопределенные). Формулы для всех расчетов приводятся в инструкциях производителей.

9.7. При разведении образцов сывороток и других ингредиентов необходимо тщательно перемешивать рабочие растворы.

9.8. При использовании замороженных образцов сывороток необходимо их полностью разморозить и затем перемешать пипетированием. Все лунки планшета должны равномерно заполняться вносимыми реагентами.

9.9. При промывании планшетов необходимо заполнять лунки промывочным раствором полностью. Необходимо избегать подсыхания лунок планшетов между внесением растворов. При ошибке процедуры внесения испытуемых образцов в лунки планшета анализ данного образца проводят в чистой лунке.

9.10. Учет результатов иммунологических исследований проводят согласно формулам для определения диагностического значения реакции, описанным в инструкции.

9.11. Остатки биологического материала подлежат обеззараживанию в соответствии с действующими нормативными документами. Измерительные приборы (спектрофотометры) и дозаторы подлежат метрологической поверке 1 раз в год.

X. Контроль качества. Общие требования

10.1. Внутренний контроль качества

10.1.1. Основная цель внутреннего контроля качества (ВнКК) – проверка достоверности полученных результатов, которая в общих рамках обеспечения системы-качества должна охватывать три существующих этапа лабораторных исследований: преаналитический, аналитический и постаналитический.

10.1.2. На достоверность полученных результатов исследования могут влиять следующие факторы:

1) на преаналитическом этапе исследований:

– несоблюдение правил подготовки пациента к исследованию;

– несоблюдение правил отбора проб;

– ошибка при маркировке пробы;

– несоблюдение условий транспортирования и хранения образцов;

– нарушения процедуры пробоподготовки.

2) на аналитическом этапе исследований:

– ненадлежащая подготовка оборудования для анализа;

– ненадлежащее качество используемых реактивов и референс-материалов;

– нарушение технологических процедур в работе;

– нарушение процедуры ВнКК;

– недостаточная компетентность сотрудников, выполняющих исследования.

3) на постаналитическом этапе исследования:

– некорректный способ учета результатов анализов;

– недостаточная квалификация сотрудников, которые проводят учет результатов анализа.

10.2. Внешний контроль качества

10.2.1. Внешний контроль качества (ВКК) проводится в соответствии с тестовой программой, состоящей из многочисленных испытуемых образцов, которые с определенной периодичностью одновременно направляются в разные лаборатории для проведения исследования с целью получения среднестатистических погрешностей методов анализа и достоверности полученных результатов идентификации. По результатам ВКК составляют отчеты. Проведение ВКК позволяет измерить сте-

пень межлабораторных вариаций; сравнить и оценить методы, реактивы и лабораторные приборы для исследований; выявить производительность лаборатории; определить «истинные» значения результатов и их наглядность; проанализировать факторы, влияющие на качество исследований (например, интерференции); инициировать корректирующие меры. В системе менеджмента контроля участие учреждений в ВКК является квалификационным критерием оценки деятельности лабораторий и учитывается при проведении аккредитации и сертификации заявленных видов работ и услуг.

10.2.2. Проведение внутреннего и внешнего контролей достоверности результатов лабораторных исследований регламентируется национальными и международными стандартами в области требований к профессиональному уровню исследований в межлабораторном сравнении.

XI. Общая характеристика паразитозов и порядок проведения иммунологических исследований при диагностике паразитарных болезней

11.1. Гельминтозы

11.1.1. Анизакидоз

Анизакидоз – личиночный зоонозный биогельминтоз. Характеризуется хроническим течением, поражением желудочно-кишечного тракта и токсико-аллергической симптоматикой.

Возбудители анизакидоза – личинки нематод семейства *Anisakidae*. Окончательными хозяевами анизакид являются морские млекопитающие (китообразные и ластоногие), в кишечнике которых паразитируют взрослые паразиты – тонкие черви до 6,5 см длиной. Яйца паразитов попадают в воду, где из яиц развиваются личинки, которых заглатывают промежуточные хозяева – морские ракообразные, их в свою очередь заглатывают рыбы – треска, сельдь, палтус, хек, навага, зубатка, морские окуни, камбала, мойва, пикша, путассу, а также проходные рыбы – семга, кета, горбуша, голец. Меньшее значение имеют моллюски и некоторые ракообразные. Личинки у разных видов рыб локализуются в мускулатуре, полостях или внутренних органах.

Зараженность анизакиидами рыбы и других морских животных наблюдается во всех географических зонах Мирового океана, но наиболее высока она в северных регионах. Наиболее высокая заболеваемость анизакидозом человека регистрируется в Японии, где распространено употребление блюд из сырой рыбы и моллюсков. Спорадические случаи регистрируются в странах Западной Европы, США, России, Тихоокеанском побережье Латинской Америки.

Заражение человека происходит при употреблении в пищу сырых или недостаточно термически обработанных инвазированных рыбы, креветок, крабов, кальмаров.

Наиболее часто личинки локализуются в желудке, реже в кишечнике и других органах. В месте внедрения личинки возникает воспалительная реакция, что клинически может сопровождаться болями различной интенсивности, тошнотой, лихорадкой с ознобом, крапивницей, иногда симптомами кишечной непроходимости. В хронической стадии вокруг внедрившейся в слизистую оболочку личинки формируется эозинофильная гранулема, воспалительная реакция по типу феномена Артюса, абсцесс. Из кишечника личинки могут мигрировать во внутренние органы – висцеральная форма *larva migrans*. Клиническая симптоматика в этих случаях определяется локализацией личинки. В тяжелых случаях возможны осложнения – прободение стенки желудка или кишечника.

Диагноз устанавливают при гастроскопии и исследовании удаленной личинки. В качестве вспомогательного метода используется ИФА для определения антител к антигенам анизакид у пациента с подозрением на инвазию анизакидами.

Показания к иммунологическому обследованию на анизакидоз:

– симптоматика поражения желудочно-кишечного тракта и аллергические проявления после употребления морской рыбы, моллюсков и ракообразных в сыром или недостаточно термически обработанном виде;

– указания на употребление в пищу сырой, слабосоленой, копченой, непроваренной или непрожаренной морской рыбы и морских моллюсков и ракообразных, особенно в районах Дальнего Востока России, Камчатки, Японии, Корее, Нидерландах, Северной части Тихоокеанских регионов США.

11.1.2. Аскаридоз

Аскаридоз – паразитарное заболевание, вызываемое паразитированием кишечной нематоды *Ascaris lumbricoides*. Жизненный цикл возбудителя включает раннюю – миграционную и позднюю – кишечную стадии заболевания. Клинические проявления аскаридоза определяются стадией жизненного цикла возбудителя, интенсивности инвазии и состояния иммунной системы. Для ранней миграционной стадии характерны выраженные в различной степени симптомы инфекционно-аллергического заболевания (лихорадка, легочный синдром, эозинофильно-лейкемоидная реакция крови). В хронической стадии преобладают диспепсические расстройства, болевой синдром. В этой стадии при массивной инвазии возможны осложнения (кишечная непроходимость,

миграция взрослых аскарид в желчные протоки, протоки поджелудочной железы, бронхи)

Иммунологическая диагностика аскаридоза может быть эффективна в миграционной фазе и начальной кишечной стадии инвазии, до начала яйцепродукции.

При кишечной стадии инвазии иммунологические исследования являются **вспомогательными** к комплексу клинико-лабораторных исследований. Иммуноферментный анализ с антигеном аскарид может использоваться при сероэпидемиологических исследованиях, а также как предварительный тест у лиц с подозрением на паразитарное заболевание, и требует **обязательного паразитологического подтверждения**.

Процедура оценки результатов устанавливается производителем диагностического набора реагентов в инструкции по применению.

Возможен перекрест иммунологических реакций при заболеваниях описторхозом, токсокарозом, трихинеллезом и эхинококкозом, а также при микст-инвазиях, как результат взаимодействия антител с гетерологичным антигеном за счет иммунологических перекрестов между антигенами.

Показания к обследованию на аскаридоз:

– наличие желудочно-кишечных заболеваний;

– наличие эозинофилии неясной этиологии;

– оперативное вмешательство в брюшной полости;

– наличие риска профессионального заболевания.

11.1.3. Клонорхоз

Клонорхоз – паразитарное заболевание хронического течения, вызываемое трематодой *Opistorchis sinensis (Clonorchis sinensis)* и характеризующееся поражением гепатобилиарной системы и поджелудочной железы.

Источником инвазии является человек, домашние и дикие животные (рыбоядные). Фактором передачи является рыба семейства карповых. В Китае дополнительным хозяином клонорхоза являются также креветки. Зона эндемии охватывает Китай, Японию, Лаос, Вьетнам, Корею. В Российской Федерации очаги клонорхоза встречаются только в Приамурье на Дальнем Востоке.

В ранней стадии протекает как острое инфекционно-аллергическое заболевание с лихорадкой, увеличением печени, селезенки и гиперэозинофильным лейкоцитозом. В хронической стадии наблюдается симптомокомплекс поражения гепатобилиарной системы, возможны клинические проявления аллергии и непостоянная эозинофилия периферической крови.

На ранней стадии инвазии, до начала яйцепродукции, при манифестном течении диагноз клонорхоза устанавливается на основании клинической картины общего аллергоза с лихорадкой, арталгиями, миалгиями, лимфоаденопатией, увеличением печени, эозинофилией крови, лейкоцитозом, увеличением СОЭ; данных эпиданамнеза (употребление рыбы семейства карповых из эндемичных по клонорхозу районов) и результатов иммунологического обследования. Наличие антител к клонорхисам в сыворотке (плазме) крови пациента подтверждает диагноз клонорхоза.

В хронической стадии инвазии после начала выделения паразитом яиц основным методом диагностики клонорхоза является паразитологический, включающий 3—5-кратное исследование кала методами обогащения и (или) дуоденальное зондирование. Иммунологические методы выявления антител применяются в качестве вспомогательных методов и назначаются на начальных этапах обследования пациентов с подозрением на паразитарную инвазию. Положительный результат иммунологического теста должен быть обязательно подтвержден паразитологически, а отсутствие специфических антител в крови пациента не гарантирует отсутствие инвазии. Необходимо учитывать, что в ряде случаев возможны ложноположительные реакции ИФА, что может быть связано как с микст-инвазиями, так и с неспецифическими реакциями.

Для диагностики хронического клонорхоза целесообразно использовать комплекс методов, включающий в себя исследование сыворотки крови на наличие специфических иммуноглобулинов и 3—5-кратное исследование кала двумя копроовоскопическими методами (методом седиментации и методом Като-Миура), что позволит повысить эффективность выявления инвазии.

Контроль эффективности лечения клонорхоза проводится только паразитологическими методами.

Показания к иммунологическому обследованию на клонорхоз:

– эозинофильная лейкемоидная реакция у лиц, употреблявших в пищу карповых рыб (сазан, белый и черный амур, толстолоб, верхогляд) из эндемичных по клонорхозу регионов;

– эозинофилия периферической крови неясного генеза;

– симптомы поражения гепатобилиарной системы, аллергические проявления, в эпиданамнезе имеется указание на употребление рыбы семейства карповых из эндемичной по клонорхозу территории;

– наличие риска профессионального заболевания;

– проведение серологического мониторинга за уровнем пораженности населения на эндемичных территориях.

11.1.4. Описторхоз

Описторхоз – паразитарное заболевание хронического течения, вызываемое трематодами *Opisthorchis felineus u Opisthorchis viverrini*. В ранней стадии протекает как острый аллергоз, в хронической стадии наблюдается симптомокомплекс поражения гепатобилиарной системы, возможны клинические проявления аллергии и непостоянная эозинофилия периферической крови. *Opisthorchis felineus* распространен в бассейнах рек Обь, Иртыш, Енисей, Урал, Волга, Кама, Дон, Днепр, Северная Двина, Припять, Неман. Очаги описторхоза, вызываемого *Opisthorchis viverrini* расположены в Юго-Восточной Азии (Таиланд, Лаос, Камбоджа, на Тайване, в части Индии). Источником инвазии являются: человек, домашние и дикие плотоядные млекопитающие. Заражение происходит при употреблении в пищу необезвреженной речной рыбы семейства карповых (язь, лещ, чебак, плотва и др.).

В ранней фазе описторхоз часто протекает как острый аллергоз с лихорадкой до 39 °С, увеличением печени, субиктеричностью склер и нёба, эозинофилией – 15—80 %, повышением СОЭ – до 20—45 мм/ч, лейкоцитозом – 10—12 $\times$ 10^9/л, увеличением активности трансаминаз. Если в анамнезе пациента есть указание на употребление рыбы семейства карповых за 2—4 недели до начала заболевания, то его необходимо обследовать для исключения или подтверждения описторхозной инвазии. Так как описторхисы начинают продуцировать яйца через 3—4 недели от момента заражения, то в течение этого периода результаты паразитологических исследований будут отрицательными. В таких случаях для подтверждения диагноза описторхоза определяют специфические антитела классов М и G к описторхисам в сыворотке (или плазме) крови методом ИФА. Наличие антител к антигенам описторхисов : АТМ в титрах 1 : 800 и выше или наличие двух классов антител – АТМ в титрах 1 : 400 и выше плюс АТG 1 : 400 и выше в комплексе с клиническими, лабораторными и эпидемиологическими данными позволяет выявить раннюю стадию описторхозной инвазии. Чувствительность ИФА при остром описторхозе приближается к 100 %. Ложноположительные результаты анализа возможны за счет перекрестных реакций с антигенами эхинококков, токсокар, трихинелл, фасциол.

Кроме того, при определение антител класса М возможны перекрестные реакции с ревматоидным фактором.

Паразитологические методы являются основными в лабораторной диагностике описторхоза после начала яйцепродукции паразитом. Серологические методы должны использоваться как вспомогательные в комплексном обследовании пациентов с подозрением на описторхозную инвазию. Ограниченное использование серологических методов диагностики, в частности метода ИФА, связано со снижением выработ-

ки специфических антител по мере хронизации описторхозной инвазии. Первыми исчезают антитела класса М, а уровень антител класса G зависит от интенсивности инвазии, давности и кратности заражения, функционального состояния иммунной системы. Чувствительность ИФА при хроническом описторхозе составляет 50—80 %. Ложноположительные реакции возможны при исследовании сыворотки здоровых лиц в 1,0 % случаев, больных непаразитарными заболеваниями (аллергозы, патология желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарной системы, системные заболевания) – в 1,5 %, токсоплазмозом – в 5,6 %, токсокарозом – в 7,3 %, эхинококкозом – в 15,4 %, трихинеллезом – в 20,0 %, фасциолезом – в 29,4 % случаев.

Серологические методы, в частности ИФА, рекомендуется использовать на первом этапе обследования на описторхоз или клонорхоз. Положительные результаты ИФА (наличие антител к возбудителю гельминтоза в сыворотке крови пациента) должны быть обязательно подтверждены паразитологическими методами. В то же время, отрицательные результаты ИФА не гарантируют отсутствия инвазии.

Для диагностики хронического описторхоза целесообразно использовать комплекс методов, включающий в себя исследование сыворотки крови на наличие специфических иммуноглобулинов и 3—5-кратное исследование кала двумя копроовоскопическими методами (методом седиментации и методом Като-Миура), что позволит повысить эффективность выявления инвазии.

Контроль эффективности лечения описторхоза проводится только паразитологическими методами.

Показания к иммунологическому обследованию на описторхоз:

– эозинофильная лейкемоидная реакция у лиц, употреблявших в пищу карповых рыб (язь, лещ, плотва, елец, подуст, сазан, жерех) из эндемичных по описторхозу регионов;

– эозинофилия периферической крови неясного генеза;

– наличие симптомов поражения гепатобилиарной системы с различными аллергическими проявлениями, в эпиданамнезе имеется указание на употребление рыбы семейства карповых из эндемичной по описторхозу территории;

– наличие риска профессионального заболевания;

– проведение серологического мониторинга за уровнем пораженности населения на эндемичных территориях.

11.1.5. Стронгилоидоз

Стронгилоидоз – хронически протекающий гельминтоз с преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта и аллергическими проявлениями.

Возбудитель стронгилоидоза – нематода *Strongyloides stercoralis*. Половозрелые формы гельминта обитают у человека в двенадцатиперстной и тощей кишках. При интенсивном заражении возбудитель может проникать в пилорический отдел желудка, слепую и ободочную кишки, а также в протоки поджелудочной железы. При интенсивной инвазии и выраженных нарушениях иммунной системы возможна генерализация гельминта в различные органы. Заражение стронгилоидами происходит через кожу при контакте с землей, содержащей инвазионные личинки стронгилоидов, а также через рот с пищей или водой.

Стронгилоидоз распространен преимущественно в странах с жарким, влажным климатом: Южная Америка, Некоторые страны Африки, Италия, Франция, Украина, Молдова, Армения. В России встречаются небольшие очаги стронгилоидоза.

В острой миграционной стадии стронгилоидоз протекает как острое инфекционно-аллергическое заболевание с лихорадкой, гепатоспленомегалией, кожным синдромом, гиперэозинофильным лейкоцитозом. Иногда, особенно у детей, наблюдается эозинофильная мигрирующая пневмония. В хронической стадии выражены симптомы поражения пищеварительной системы, непостоянные симптомы аллергии.

Диагноз стронгилоидоза устанавливают при обнаружении личинок стронгилоидов в фекалиях (по методу Бермана) или дуоденальном содержимом больного. При низкой интенсивности инвазии возникают диагностические сложности. В качестве вспомогательного используют иммунологический метод (ИФА) для выявления IgG к антигену стронгилоидов.

Показания к иммунологическому обследованию на стронгилоидоз:

– эозинофильный лейкоцитоз неясного генеза;

– наличие симптомов поражения гепатобилиарной системы с различными аллергическими проявлениями, в эпиданамнезе имеется указание на проживание (или посещение) на эндемичных по стронгилоидозу территориях.

11.1.6. Токсокароз

Токсокароз – паразитарное заболевание, вызываемое миграцией в организме человека личинок гельминтов собак – *Toxocara canis,* реже – кошек – *Toxocara mystax.*

Заболевание характеризуется комплексом симптомов и синдромов, обозначаемых как *Visceral Larva migrans* (бронхообструктивный синдром различной степени тяжести, мигрирующие эозинофильные инфильтраты в легких, кожные аллергические проявления, гиперэозинофильный синдром). Токсокароз распространен практически повсемест-

но. Проблема токсокароза обусловлена широкой циркуляцией возбудителя в природной среде и отсутствием надлежащих мер по дегельминтизации собак и кошек. Заражение человека происходит в результате проглатывания зрелых яиц токсокар с пищей или водой. Человек для токсокар является биологическим тупиком, так как в его организме токсокары не заканчивают свой цикл развития.

Паразитологическое подтверждение инвазии токсокарами практически невозможно, поэтому ведущая роль в диагностике токсокароза отводится иммунологическим методам.

В острой стадии заболевания регистрируются специфические антитела класса М, позднее нарастает уровень антител класса G. Чувствительность ИФА у больных токсокарозом составляет около 78 %, специфичность – 92 %. Однако повышенные титры специфических IgG не свидетельствуют о наличии жизнеспособных личинок токсокар в организме пациента и не могут служить критерием эффективности терапии.

При постановке ИФА инструкцией по применению диагностического набора предусмотрено, что диагностическим титром является 1 : 800. Показатели оптической плотности (ОП) при титрах 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400 можно учитывать при анализе клинической картины заболевания и требуют повторения ИФА.

В редких случаях у больных с различными нарушениями иммунитета или при наличии системной патологии непаразитарной природы, например, при некоторых лимфо- и гемопролиферативных заболеваниях, возможны ложноположительные результаты ИФА на токсокароз даже в очень высоких титрах. Такие результаты требуют серьезного анализа и учета всех сопутствующих факторов.

Серьезные трудности возникают и при диагностике глазного токсокароза. При глазном токсокарозе антитела к антигену токсокар в ИФА не выявляются или они присутствуют в низких титрах 1 : 200, 1 : 400. При поражении параорбитальной области антитела также могут выявляться в низких титрах.

Ложноотрицательные результаты анализа могут наблюдаться у больных в ранней стадии инвазии.

Показания к обследованию на токсокароз:

– лейкемоидная реакция эозинофильного типа с характерным эпидемиологическим анамнезом (например: геофагия);

– хронический рецидивирующий бронхит, бронхиальная астма неясного генеза; уртикарная сыпь на фоне эозинофилии крови;

– лимфаденопатия;

– наличие риска профессионального заболевания.

11.1.7. Трихинеллез

Трихинеллез – острое паразитарное заболевание человека и млекопитающих, протекающее с лихорадкой, миалгиями, отеками, кожными высыпаниями, высокой эозинофилией крови.

При тяжелом течении болезнь осложняется миокардитом, очаговым или диффузным поражение легких, центральной нервной системы аллергической природы, системными сосудистыми поражениями.

Возбудители трихинеллеза – круглые гельминты семейства *Trichinellidae.*

Трихинеллез распространен во всех климатических зонах, включая Арктику, Антарктику, тропический пояс. Человек заражается трихинеллами при употреблении в пищу инвазированной трихинеллами свинины, а также мяса диких животных: медведя, барсука, кабана.

Характер и выраженность клинической симптоматики, особенности клинического течения трихинеллеза определяются рядом факторов: интенсивностью инвазии (число личинок в съеденном мясе); особенностями кулинарной обработки мяса (сырой фарш, продолжительность варки, копчение, соление); видом трихинелл; состоянием иммунной системы больного.

Иммунологическая диагностика трихинеллеза осуществляется с учетом биологических особенностей возбудителя заболевания, а также состояния иммунной системы инвазированного. Антитела к антигенам трихинелл выявляются не ранее чем через 2 недели от начала инвазии (момента возможного заражения). Это ограничивает диагностическую значимость иммунологических методов в случае короткой инкубации инвазии, при которой наблюдается наиболее тяжелое течение заболевания, требующее проведения немедленных лечебных мероприятий. У лиц с подозрением на трихинеллез и получавших превентивное лечение иммунологическое (серологическое) обследование проводят через 2—3 недели с начала инвазии.

Выработка специфических антител происходит в период миграции личинок трихинелл, а выявление АТ с помощью иммунологических реакций – в период накопления паразита в мышцах, которое начинается на 15—20-е сутки после заражения при средней интенсивности инвазии (200—500 личинок на 1 г съеденного мяса). При меньшей интенсивности инвазии сроки начала выявления АТ увеличиваются. При гиперинвазиях трихинеллеза возможна отрицательная реакция при серологических исследованиях на АТ. У наиболее тяжелых больных с высокой интенсивностью инвазии при отсутствии антител в ИФА целесообразно определение циркулирующего антигена.

Если источником заражения человека является мясо диких животных (медведь, кабан, барсук, нутрия), то в течение 2—4 месяцев показатели иммунологических реакций могут нарастать. Через 4—5 месяцев после заражения эти показатели снижаются, однако остаются на диагностическом уровне не менее 1,5 лет, а при интенсивном заражении – до 2—2,5 лет и более.

Иммунологические методы лабораторной диагностики трихинеллеза служат для подтверждения клинически установленного диагноза.

В ранней стадии заболевания целесообразно применять ИФА для выявления IgM.

Показания к обследованию на трихинеллез:

– в эпиданамнезе употребление в пищу мяса свиньи, медведя, кабана и других животных (потенциальных хозяев трихинелл), подозрительных на зараженность трихинеллезом;

– проведение серологического мониторинга на эндемичных территориях;

– лихорадка неясного генеза, отек лица, миалгия, эозинофилия;

– миокардиты, менингоэнцефалиты неясного генеза, протекающие с гиперэозинофилией;

– лейкемоидная реакция по эозинофильному типу неясного генеза.

11.1.8. Фасциолез

Фасциолез – биогельминтоз хронического течения с преимущественным поражением гепатобилиарной системы.

Возбудители фасциолеза – два вида трематод – *Fasciola hepatica* и *F. gigantica* – паразитируют в желчных протоках печени у многих травоядных животных и иногда у человека. Заражение фасциолезом происходит при употреблении в пищу растений, произрастающих на влажных пастбищах, медленно текущих водоемах (кресс-салат, дикий лук), к стеблям которых прикрепляются инцистированные личинки – адолескарии. Возможно заражение при питье воды из зараженного водоема. Фасциолез распространен в районах с развитым животноводством.

В острой стадии фасциолез протекает как острое инфекционно-аллергическое заболевание, симптоматика которого сходна с симптоматикой острой стадии описторхоза, но при фасциолезе у больных чаще развивается аллергический миокардит. В хронической стадии преобладают симптомы поражения гепатобилиарной системы. Характерен также внезапно возникающий острый болевой синдром, сопровождающийся быстрым увеличением размеров печени (симптом Курлова).

Диагноз фасциолеза устанавливают при обнаружении яиц фасциол в дуоденальном содержимом. При исследовании фекалий возможно

обнаружение транзиторных яиц, что наблюдается в случаях употребления продуктов, содержащих печень травоядных животных, инвазированных фасциолами. При нахождении яиц фасциол в копрематериале необходимо повторное исследование при исключении из пищи печени травоядных животных.

Диагностические сложности наблюдаются также в ранней (миграционной) стадии фасциолеза в течение 3—4 месяцев от момента заражения до начала яйцепродукции. В таких случаях проводят исследование крови пациента на наличие антител к антигенам фасциол и результаты реакции учитывают при постановке диагноза в совокупности с клинической картиной, эпиданамнезом. В хронической стадии инвазии иммунологические методы применяют на первых этапах обследования пациента с последующим подтверждением диагноза паразитологическими методами. Необходимо учитывать вероятность получения как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов иммунологических методов.

Контроль эффективности лечения фасциолеза проводят **только паразитологическими методами.**

Показания к иммунологическому обследованию на фасциолез:

– лейкемоидная реакция эозинофильного типа;

– аллергический миокардит неясной этиологии и другие аллергические реакции у лиц с характерным эпидемиологическим анамнезом (проживание на эндемичной территории;

– в эпиданамнезе употребление в пищу водных дикорастущих трав, некипяченой воды из непроточных водоемов, посещение эндемичных стран (Юго-Восточная Азия, Узбекистан);

– наличие симптомов поражения гепатобилиарной системы, периодические или постоянные аллергические реакции, проживание на эндемичных территориях или посещение их;

– проведение серологического мониторинга на эндемичных территориях;

– наличие риска профессионального заболевания.

11.1.9. Цистицеркоз

Цистицеркоз – хронический гельминтоз человека, вызываемый паразитированием личиночной стадии – цистицерка (финны) цепня свиного.

Возбудитель цистицеркоза – личиночная форма цестоды *Taenia solium – Cysticercus cellulosae* – представляет собой пузырек размерами 5—8 мм, при локализации в желудочках мозга и в глазу может достигать 10—15 мм, заполненный прозрачной жидкостью, содержащий

ввернутый внутрь сколекс по строению аналогичный сколексу взрослого цепня.

Локализация цистицерков: у свиней – межмышечная соединительная ткань, у человека – подкожная клетчатка, головной мозг, глаз, мышцы, сердце, печень, легкие и брюшина. Человек заражается цистицерками в случаях аутосуперинвазии при инвазии кишечника половозрелой формой цепня свиного или при заглатывании яиц (онкосфер) *T. solium*. Симптоматика заболевания определяется числом и локализацией цистицерков. Интенсивная инвазия с многофокусным поражением головного мозга при отсутствии своевременного и эффективного лечения (оперативного и/или противопаразитарного) приводит к инвалидизации больного с возможным летальным исходом. Летальный исход наблюдается и при рацимозной форме инвазии.

При локализации в других органах заболевание протекает чаще всего бессимптомно и выявляется случайно при инструментальном обследовании больного по поводу других заболеваний (рентгенография, УЗИ, КТ) или посмертно при патолого-анатомическом вскрытии.

ИФА с антигеном *Taenia solium* является эффективным методом лабораторной диагностики цистицеркоза в комплексе с инструментальными, клиническими и эпидемиологическими данными.

При иммунологической диагностике цистицеркоза возможна регистрация ложноположительных результатов, возникающих при наличии в крови неспецифических антител, сходных по структуре с антителами к цистицеркам. Наиболее часто ложноположительные результаты на цистицеркоз выявляются при некоторых других гельминтозах – описторхоз, фасциолез и эхинококкозы. Отрицательный результат не исключает диагноза цистицеркоза.

Подлежат иммунологическому обследованию на цистицеркоз:

– больные с токсико-аллергическими симптомами после употребления свинины;

– больные с диспепсическим синдромом и периодическим выделением члеников при дефекации, но неподтвержденным диагнозом тениоза копрологически;

– больные с неврологической симптоматикой, особенно в случаях очагового поражения головного мозга, выявляемого при МРТ;

– больные с глазными поражениями неясного генеза, выявляемыми при офтальмологическом обследовании;

– больные с очаговыми поражениями мышц, выявляемыми при физикальном обследовании, УЗИ или рентгенографии;

– контингенты риска профессионального заболевания.

11.1.10. Шистосомозы

Шистосомозы – группа тропических гельминтозов, характеризующихся в острой стадии токсико-аллергическими реакциями, в хронической – преимущественным поражением кишечника или мочеполовой системы.

Возбудители шистосомозов – раздельнополые трематоды. *Schistosoma haematobium* – возбудитель мочеполового шистосомоза и *Schistosoma mansoni* – возбудитель кишечного шистосомоза. Имеются также другие виды шистосом более редко встречающиеся.

При мочеполовом шистосомозе наблюдаются симптомы поражения мочеполовой системы – гематурия, воспалительные и инфильтративные процессы в мочевом пузыре, позднее присоединяются симптомы поражения у мужчин – семенных канатиков, яичек, предстательной железы, а также сопредельных органов, у женщин – поражение слизистой влагалища, шейки матки, яичников.

При кишечном шистосомозе наблюдаются воспалительные, инфильтративные, гранулематозные изменения толстого кишечника с исходом в фиброз.

Шистосомозы распространены в странах Среднего Востока, Африки, Австралии, Южной Америке и других. Инвазирование происходит при контакте с водой, зараженной церкариями шистосом, которые активно внедряются через кожные покровы или слизистую оболочку ротоглоточной полости в организм человека.

Диагноз шистосомоза устанавливают при обнаружении яиц шистосом в моче или фекалиях. В качестве вспомогательного метода применяют иммунологический метод – ИФА для выявления IgG.

Показания к иммунологическому обследованию на шистосомозы:

– подозрение на шистосомоз в комплексе с паразитологическими, лабораторными, эпидемиологическими и клиническими данными;

– проведение серологического мониторинга населения на эндемичных территориях.

11.1.11. Эхинококкозы

Гидатидозный эхинококкоз (возбудитель – личиночная форма цестоды *Echinococcus granulosus*) – хроническое паразитарное заболевание, характеризующееся развитием в печени, реже – в легких и других органах солитарных и множественных кистозных образований.

Альвеолярный эхинококкоз (возбудитель – личиночная форма цестоды *Echinococcus multilocularis*) – тяжелое хроническое заболевание, характеризующееся развитием в печени солитарных или множественных опухолевидных образований паразитарной природы, растущих инфильтративно и способных метастазировать в различные органы.

При диагностике эхинококкозов наряду с аппаратными и инструментальными методами исследования в обязательном порядке используются серологические методы, позволяющие выявлять антитела к антигенам эхинококков. В практике наиболее часто с диагностической целью применяют ИФА, с помощью которого при наличии паразитарной кисты или узла выявляются антитела к эхинококковому антигену независимо от видовой принадлежности и генотипа паразита.

Наличие общих антигенных компонентов для двух близкородственных видов тениид – *E. granulosus* и *E. multilocularis* – служит причиной перекреста в иммунологических реакциях. В ряде случаев у больных альвеококкозом определяются положительные результаты при использовании серологических тест-систем на эхинококкоз однокамерный.

При оценке результатов серологического исследования на эхинококкозы следует учитывать возможность получения ложноположительных результатов. Такие результаты наблюдаются при некоторых соматических и инфекционных заболеваниях, сопровождающихся обширными деструктивными процессами в пораженных органах (цирроз печени, туберкулез легких и других органов), при онкологических заболеваниях и некоторых других гельминтозах – описторхоз, фасциолез и цистицеркоз, а также при различных аллергозах. Положительный результат ИФА при отсутствии эхинококковых кист внутренних органов должен расцениваться как ложноположительный. Оценку результатов проводят согласно инструкции по применению набора реагентов для ИФА-метода.

Для мониторинга развития патологического процесса и оценки результатов лечения эхинококкозов целесообразнее использовать метод учета реакции ИФА в антительных единицах (АЕ). При эхинококкозах показатель АЕ меньше 30 единиц оценивается как слабоположительный, 30—70 – как положительный, АЕ больше 70 – как резкоположительный.

Низкая концентрация или отрицательный результат могут быть выявлены в ранний период болезни (кисты диаметром до 2 см), а также при погибших или кальцифицированных ларвоцистах. Снижение показателей концентрации антител может наблюдаться в поздней или терминальной стадии заболевания.

Отрицательные результаты также могут наблюдаться при наличии больших (около 10 см и более в диаметре) кист, что связано с наличием циркулирующих иммунных комплексов «антиген–антитело», не выявляемых с помощью наборов, предназначенных для определения специфических антител.

При наличии кист, выявляемых инструментальными и аппаратными методами и не имеющих классических клинических и структурных признаков эхинококкозов, и отрицательной серологической реакции необходимо динамическое наблюдение больного с повторным инструментальным и серологическим обследованием. В случаях с четкими клиническими и инструментальными признаками эхинококкоза решается вопрос лечебной тактики без учета результатов серологической реакции. Таким больным повторное иммунологическое обследование следует проводить после оперативного лечения, в процессе и по окончании противопаразитарной терапии и в последующем, в соответствии с длительностью диспансерного наблюдения, вплоть до снятия больного с учета.

Больной с установленным диагнозом эхинококкоз направляется на лечение (оперативное, противопаразитарное или сочетанное) с последующим диспансерным наблюдением.

Больной гидатидозным эхинококкозом должен находиться на диспансерном наблюдении в течение 5 лет. В течение всего периода диспансерного наблюдения больному необходимо проводить иммунологические исследования, периодичность которых устанавливается индивидуально в зависимости от объема исходного поражения и характера лечения, но не реже одного раза в год. Увеличение концентрации антител может свидетельствовать о возникновении рецидива заболевания.

Подлежат обследованию на эхинококкозы:

– лица с увеличением печени, болями в области печени различного характера, тяжестью в правом подреберье, желтушностью кожных покровов и склер, кашлем, болями в грудной клетке, новообразованиями и др.;

– лица, у которых впервые выявлены новообразования в паренхиматозных органах;

– лица, состоящие на диспансерном наблюдении по эхинококкозу, и члены их семей;

– контингенты риска эхинококкоза как профессионального заболевания.

Показанием к обследованию является также проведение серологического мониторинга за уровнем пораженности населения на эндемичных территориях.

11.2. Протозоозы

11.2.1. Амебиаз

Амебиаз – протозойная инфекция в клинически выраженных случаях проявляющаяся язвенным поражением толстого кишечника, а так-

же развитием абсцессов в печени и других органах. Возбудитель амебиаза – дизентерийная амеба *Entamoeba histolytica.*

В организме человека дизентерийная амеба может существовать в виде вегетативной формы (большая вегетативная или тканевая форма – патогенная), мелкой вегетативной формы (комменсальная или просветная) и в виде цистной формы.

Образование специфических антител класса IgG и IgM у больных амебиазом и практически их отсутствие при бессимптомном носительстве позволило использовать антиамебные антитела в качестве индикаторов тканевой инвазии.

При амебиазе РНИФ обладает высоким диагностическим потенциалом при выявлении этой инфекции за счет высокой чувствительности, специфичности и воспроизводимости.

Более 95 % больных абсцессом печени (АП) и другими формами внекишечного амебиаза (ВА) способны продуцировать специфические антитела в титрах от 1 : 160 до 1 : 1 280.

При кишечном амебиазе не более 75—80 % больных имеют титры антител 1 : 40—1 : 80, особенно в случаях вялотекущих, стертых форм амебиаза.

Первым диагностически значимым титром РНИФ является 1 : 80.

При скрининге-титре (1 : 40), часто наблюдаемом у лиц, вернувшихся из эндемичных по амебиазу территорий, исследование следует повторить через 12—14 дней.

При этиотропной терапии у больных, как правило, наблюдается нарастание титров антител в 2 и более раз.

Результаты РНИФ в низких титрах (1 : 20—1 : 40) могут быть зарегистрированы у лиц, переболевших амебиазом.

Длительность персистенции специфических антител после лечения составляет 3—15 месяцев.

У переболевших последовательное снижение уровня антител ниже 1 : 20 является показателем эффективного лечения, в противном случае с появлением клинических симптомов подъем титров антител следует расценивать как рецидив инфекции.

Ложноположительный результат в титре 1 : 40 может наблюдаться у больных с системным аутоиммунным и онкологическим процессом (III—IV стадии).

Для иммунологической диагностики амебиаза используют также иммунохроматографический метод (ИХА) определения антигенов дизентерийной амебы в копроматериале.

Показания к иммунологическому обследованию на амебиаз:

– верификация клинического диагноза внекишечного амебиаза;

– необходимость оценки эффективности лечения; выявление рецидива заболевания;

– выявление осложнений кишечного амебиаза, приведших к образованию внекишечных очагов заболевания;

– проведение серологического мониторинга пораженности амебиазом населения на эндемичных территориях.

11.2.2. Висцеральный лейшманиоз

Висцеральный лейшманиоз – тяжелое заболевание, сопровождающееся лихорадкой, увеличением селезенки, печени и поражениями других органов с возможным летальным исходом. Возбудители – *Leishmania donovani, L. infantum.*

Распространение: Индия, Непал, Пакистан, Китай, Африка, страны Южной Европы. Заражение происходит трансмиссивным путем через укусы москитов.

Для иммунологической (серологической) диагностики висцерального лейшманиоза могут использоваться метод ИФА для выявления IgG.

После специфической терапии и паразитологического излечения иммуноглобулины класса IgG сохраняются в течение 6—8 месяцев, редко – до года и более.

При иммунологической диагностике висцерального лейшманиоза возможна регистрация как ложноотрицательных (у ВИЧ-инфицированных, у детей до года, а также у лиц старше 60 лет), так и ложноположительных результатов (в низких титрах, при наличии у пациента гепатита, амебиаза, лейкоза, сифилиса, системной красной волчанки).

Показания к иммунологическому обследованию на висцеральный лейшманиоз:

– необходимость подтверждения клинического диагноза;

– проведение серологического мониторинга населения на эндемичных территориях.

11.2.3. Лямблиоз

Лямблиоз – широко распространенное протозойное заболевание, вызываемое простейшими *Lamblia intestinalis,* характеризующееся поражением преимущественно тонкого кишечника, протекает в виде латентного паразитоносительства или манифестных форм.

Источником инфекции является человек. Предполагается также роль некоторых животных (собак, бобров) как источника инфекции. Механизм передачи инфекции фекально-оральный.

Пути распространения возбудителя: контактно-бытовой, пищевой, водный; известны сексуальные пути передачи среди гомосексуалистов.

Лямблиоз характеризуется полиморфизмом и неспецифичностью клинической симптоматики. Клинически выраженные случаи встречаются гораздо реже, чем бессимптомные и стертые формы инфекции.

Отсутствие патогномоничных признаков значительно осложняют клиническую диагностику лямблиоза без проведения лабораторных исследований.

Ведущими методами в диагностике лямблиоза являются паразитологические – исследование фекалий методами обогащения или (и) дуоденальное зондирование.

Для иммунологической диагностики лямблиоза используют высокоспецифичный иммунохроматографический экспресс-метод определения антигенов лямблий в пробах кала – ИХА. Используют ИХА как экспресс-метод на первом этапе обследования пациента с подозрением на лямблиоз. Положительный результат ИХА должен быть подтвержден паразитологически. Применение серологического исследования сыворотки крови на наличие антител к антигенам лямблий крайне ограничено. Антитела к лямблиям появляются в крови на 10—14-й день с момента заражения и присутствуют в крови и секретах человека практически на всех стадиях. После элиминации паразита из организма концентрация антител снижается только через 1—2 месяца. Таким образом, обнаружение специфических антител не является достоверным признаком паразитирования лямблий в настоящий момент, а может свидетельствовать о перенесенной инвазии. Кроме того, нужно учитывать факт наличия перекрестных реакций антигенов лямблий с другими паразитарными и соматическими антигенами, которые дают ложноположительные результаты.

Показанием к иммунологическому обследованию на лямблиоз является наличие:

– острых и рецидивирующих хронических желудочно-кишечных заболеваний;

– аллергии (атопический дерматит, рецидивирующая крапивница, бронхообструктивный синдром, эозинофилия неясного генеза);

– риска профессионального заболевания;

– очагов острых кишечных инфекций неясной этиологии;

– очагов водной вспышки кишечной инфекции.

11.2.4. Криптоспоридиоз

Криптоспоридиоз протозооз, обусловленный паразитированием в тонком кишечнике человека простейших отряда кокцидий из семейства *Cryptosporidiidae.*

Основными видами криптоспоридий, инфицирующих человека, является зоонозный вид *C. parvum* (поражающим как человека, так и животных) и антропонозный вид – *C. hominis*.

В клинике криптоспоридиоза различают формы субклинические и с выраженными клиническими симптомами в виде острого энтерита, гастроэнтерита.

У иммунокомпрометированных лиц, особенно при СПИДе, заболевание приобретает прогрессирующее, изнуряющее, рецидивирующее течение.

Эффективная дифференциальная диагностика с иными диарейными заболеваниями связана с иммунологическими методами исследования. Верификация диагноза криптоспоридиоза основана на обнаружении антигена криптоспоридий в пробах жидкого, водянистого, реже оформленного кала с помощью высокоспецифического иммунохромотографического экспресс-метода (ИХА).

Подлежат иммунологическому обследованию на криптоспоридиоз:

– больные с диареей, в очагах водных вспышек;

– ВИЧ-инфицированные или получавшие длительный курс лечения иммунодепрессантами, гормональными препаратами или антибиотиками;

– контингенты риска по профессиональному заболеванию (работники животноводческих и птицеферм, молокозаводов, ветеринары и зоотехники, сотрудники лабораторий);

– дети до 5—7 лет, особенно в очагах водных вспышек кишечных инфекций;

– лица, контактирующие с больными или переболевшими (реконвалесцентами).

11.2.5. Токсоплазмоз

Токсоплазмоз – зоонозная инфекция, характеризуется необычайно широким распространением среди людей и наличием трансплацентарного пути передачи.

Возбудитель токсоплазмоза – внутриклеточные простейшие *Toxoplasma gondii*.

Токсоплазмоз в большинстве случаев протекает в виде бессимптомного носительства. Клинически выраженные случаи заболевания, как правило, наблюдаются у новорождённых при внутриутробном заражении и у лиц с нарушениями иммунитета (ВИЧ-инфекция, врожденные формы тяжелого иммунодефицита, длительная иммуносупрессивная терапия), протекают как острое инфекционное заболевание различной степени тяжести с поражением лимфатической, нервной системы, глаз, миокарда, скелетных мышц и других органов и тканей.

Серологическая диагностика токсоплазмоза осуществляется с помощью ИФА и РНИФ. Методом ИФА выявляют иммуноглобулины классов M, G и A, а также ИА антител IgG. Выявление специфических антител и кинетика смены концентраций иммуноглобулинов этих классов индивидуальна и зависит от сроков инвазии, а также иммунного статуса инвазированных. Продуцирование антител класса М начинается через 7—14 дней после заражения и к 20—30-му дню эти показатели достигают максимума. Антитела М сохраняются у большинства инвазированных в течение 3—4 месяцев, однако возможно более длительное персистирование антител IgM (до 1 года). Реинфицирование токсоплазмами на фоне ранее приобретенного здорового носительства также может приводить к появлению противотоксоплазмозных IgM. Так как IgM не проникают через плаценту, определение этих антител может помочь в диагностике врожденного токсоплазмоза при неонатальном и постнатальном мониторинге.

Антитела, относящиеся к иммуноглобулинам класса G, выявляются спустя 2—3 недели после заражения, их концентрация достигает максимума через 2—4 месяца инвазии. В последующем у инвазированных наблюдается пожизненная персистенция специфических иммуноглобулинов класса G. При этом их концентрация может меняться во времени – то увеличиваясь, то снижаясь.

Антитела класса А появляются через 2 недели после заражения, пик концентрации IgA наблюдается через месяц и в 90 % случаев они сохраняются в течение 6 месяцев с момента инфицирования. Поскольку IgA не проникают через плаценту, определение их может помочь в диагностике врожденного токсоплазмоза при неонатальном и постнатальном мониторинге. Определение концентрации IgA в парных исследованиях (IgA+IgM и IgA+IgG) позволяет более точно определить период первичного заражения. Для дифференцирования первичной и паст-инфекции дополнительно используют определение ИА IgG: чем выше ИА (сила связи IgG и антигена токсоплазм), тем более длительным является заболевание. Низкие показатели авидности свидетельствуют о ранней стадии заболевания, в более поздние сроки этот показатель возрастает. Индекс авидности нарастает в первые 2—3 месяца заболевания и в дальнейшем остается стабильным. Если в крови наряду со специфическими IgM и IgA обнаруживаются низкоавидные IgG, то это свидетельствует об острой стадии первичной инфекции. Наличие специфических IgM и высокоавидных IgG предполагает длительную персистенцию специфических IgM после завершения острой стадии первичной инфекции либо реинфекцию токсоплазмами. Определение высокоавидных IgG при отсутствии IgM свидетельствует о паст-инфекции. Обнаруже-

ние низкоавидных IgG при отрицательном результате на специфические IgM возможно при сроках инфицирования более 3 месяцев. В таких случаях необходимо определять в динамике нарастание ИА. Увеличение концентрации специфических IgG в 1,5 и более раза в течение 10—14 дней и присутствие низкоавидных IgG свидетельствуют об инфицировании токсоплазмами в пределах последних 2—3 месяцев. Таким образом, дифференцировать первичную инфекцию от паст-инфекции помогает комплексный подход к диагностике – сопоставление данных всего спектра серологических маркеров: результатов выявления специфических IgA и IgM; определение ИА IgG и концентрации IgG в динамике.

Подлежат обследованию на токсоплазмоз:

– женщины, планирующие беременность;

– беременные женщины; больные ВИЧ-инфекцией;

– больные перед трансплантацией органов;

– больные лимфо- и гемопролиферативными заболеваниями и другой онкологической патологией, требующей проведения программной химиотерапии и/или повторной лучевой терапии;

– больные с полиорганными поражениям неясной природы и указаниями на возможное заражение токоплазмозом;

– больные с патологией глаз (диагностика токсоплазмозной окулопатии);

– новорождённые от инфицированной во время беременности матери;

– контингенты риска профессионального заболевания.

Показанием к обследованию является пренатальная диагностика (исследование амниотической жидкости при подозрении на возможную инфекцию у плода, особенно при выявленных пороках развития).

11.2.6. Трипаносомозы

Трипаносомозы – группа трансмиссивных тропических болезней, вызываемых простейшими рода *Trypanosome*. Различают **африканский** и **американский** трипаносомозы.

В России встречаются только завозные случаи заболевания у людей, прибывших из тропических стран.

Африканский трипаносомоз (сонная болезнь) распространен в странах тропической Африки, где в условиях риска проживает 50 млн человек, а ежегодно регистрируется до 40 новых случаев. При африканском трипаносомозе выделяют две формы инфекции – **гамбийскую** и **родезийскую**, которые различаются некоторыми биологическими, эпидемиологическими и клиническими особенностями:

– при **гамбийском трипаносомозе** основным хозяином является человек, второстепенным свинья. Переносчики возбудителя – кровососущие мухи цеце – обитают в зарослях растительности по берегам рек и ручьев и проявляют наибольшую активность в светлое время суток.

Заражение человека происходит при укусе мухи цеце, в слюнных железах которой содержатся инвазионные формы трипаносом.

Клинически выделяют две стадии: гемолимфатическую, при которой через 1—3 недели после заражения происходит распространение возбудителя по организму, и менингоэнцефалитическую (терминальную) стадию.

При своевременной диагностике и правильном лечении прогноз благоприятный, при позднем диагнозе и отсутствии лечения больные умирают в состоянии крайнего истощения через 3—6 лет от момента заражения;

– при **родезийской форме** трипаносомоза основными хозяевами и источником инфекции служат животные: антилопы, крупный рогатый скот, козы, овцы и, реже, – человек.

Переносчиком возбудителя являются мухи цеце, обитающие в саваннах и саванных лесах. Они более светолюбивые и менее требовательные к влаге, чем мухи цеце – переносчики гамбийского трипаносомоза. Человек обычно заражается во время пребывания и работы вне населенных пунктов. Чаще заболевают мужчины. Клиническая картина родезийского трипаносомоза отличается более острым и тяжелым течением и ранним поражением центральной нервной системы. Прогноз при родезийской форме трипаносомоза более тяжелый.

Американский трипаносомоз (болезнь Шагаса) – наиболее часто регистрируется в Бразилии, Аргентине, Венесуэле. Единичные случаи США (штат Техас).

Хозяевами паразита являются более 100 видов диких и домашних животных и человек. Переносчик возбудителя – клопы подсемейства *Triatominae* «поцелуйный клоп».

Основной путь передачи трипаносомоза – трансмиссивный.

Заражение человека происходит при укусе клопа и кровососании, во время которого происходит акт дефекации. Испражнения клопа, содержащие возбудителя, попадают на кожу человека, и при расчесывании места укуса через микротравмы возбудитель проникает в организм человека. Трипаносомы могут попадать в организм также при укусе клопа в область губ через слизистые оболочки или заносе трипаносом руками. Возможен и алиментарный путь передачи возбудителя с молоком матери, а также при гемотрансфузии, трансплацентарно и через

амниотическую жидкость. Врожденный трипаносомоз протекает очень тяжело и может закончиться летально.

В острой стадии инфекции происходит диссеминация возбудителя, генерализация процесса. Наблюдается лихорадка, интоксикация, увеличение всех групп лимфоузлов, селезенки, поражение сердца, неврологические нарушения. Развивается миокардит, перикардит, эндокардит, поражение проводящей системы сердца.

Диагноз трипаносомоза устанавливают на основании эпидемиологического анамнеза (пребывание в стране, где распространена эта патология, факт укуса мухи цеце или клопа – переносчиков инфекции), клинической симптоматики и результатов паразитологических методов: исследование пунктатов шанкра (место укуса мухи или клопа), увеличенных лимфоузлов, спинномозговой жидкости, в которых обнаруживают трипаносом в тонких мазках и толстых каплях, окрашенных по Романовскому-Гимза, или/и нативных препаратах.

Иммунологические методы – определение антител IgG – применяются в качестве вспомогательных при первичном обследовании пациентов с подозрением на трипаносомоз.

Показания к иммунологическому обследованию на трипаносомозы:

– подозрение на трипаносомоз, наличие соответствующей симптоматики и эпиданамнеза.

11.2.7. Малярия

Малярия – группа антропонозных протозойных трансмиссивных болезней человека, возбудители которых передаются комарами рода *Anopheles*. Характеризуется преимущественным поражением ретикулогистиоцитарной системы и эритроцитов.

У человека паразитируют 4 вида плазмодиев: *P. vivax* и *P. ovale* – возбудители 3-дневных форм малярии, *P. malaria* – возбудитель 4-дневной малярии, *P. falciparum* – возбудитель тропической малярии. Жизненный цикл возбудителей малярии осуществляется со сменой хозяев: половое развитие (спорогония) протекает в организме окончательного хозяина – самки комара рода *Anopheles*, бесполое развитие (шизогония) – в организме промежуточного хозяина – человека. Начальная фаза шизогонии происходит в печеночных клетках – гепатоцитах, последующая – в кровяном русле, в эритроцитах. В эритроцитах паразиты циклически развиваются от стадии юного трофозоита до стадии шизонта с образованием после его деления мерозоитов (от 6 до 32 в зависимости от вида возбудителя). Эритроцитарные мерозоиты инвазируют новые эритроциты и цикл повторяется. Доброкачественная 3-дневная малярия (*P. vivax*) имеет 48-часовой цикл, у овале-малярии цикл несколько пре-

вышает 48 часов, у 4-дневной малярии (*P. malaria*) цикл составляет 72 часа, у тропической злокачественной малярии цикл составляет менее 48 часов. Часть мерозоитов трансформируется в половые клетки – гаметоциты, которые обнаруживаются в крови уже в первые дни болезни при малярии вивакс, овале и четырехдневной. При неосложненном течении тропической малярии (*falciparum*) в периферической крови обнаруживаются лишь юные трофозоиты, а спустя 10—12 дней – и гаметоциты. Промежуточные же стадии этого вида развиваются в капиллярах внутренних органов. При злокачественном течении тропической малярии в периферической крови можно выявить все стадии развития трофозоитов.

Диагноз малярии устанавливается на основании клинических данных: типичной перемежающейся лихорадки, выраженного гепатолиенального синдрома, анемии; эпиданамнеза – пребывание на эндемичной территории.

Окончательный диагноз устанавливается на основании обнаружения в крови малярийных плазмодиев паразитологическими методами. В качестве дополнительных методов могут использоваться иммунологические методы, в частности, метод ИХА. На основе этого метода выпускаются индивидуальные экспресс-тесты для выявления антигенов малярийных плазмодиев в крови, которые позволяют получить результат в течение нескольких минут. Экспресс-тесты менее чувствительны, чем паразитологические методы, могут давать как ложноотрицательные, так и ложноположительные результаты. **Любой результат, полученный иммунологическим методом, должен быть подтвержден паразитологическими методами!**

Тесты на основе ИХА антигенов малярийных плазмодиев служат для экспресс обследования лиц с подозрением на малярию в «полевых» условиях: лиц, находящихся в отдаленных районах тропиков; авиапассажиров и персонала авиалиний на рейсах из эндемичных стран, если подозрение на малярию возникает во время полета; команды и пассажиров судов, посещавших тропические порты, если заболевание развивается во время плавания.

Приложение 1

ЖУРНАЛ
регистрации и учета иммунологических исследований на паразитарные болезни

Левая сторона разворота журнала

№ п/п	Дата приема материала на исследование	Ф.И.О.	Возраст	Адрес	Учреждение, направившее на обследование	Цель исследования			Метод исследования	Дата исследования	Кратность обследования	
						консультативно-диагностическая	профилактическая	по эпидпоказаниям; в очаге инвазии			первичное обследование	повторное обследование
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Правая сторона разворота журнала

Диагностические наборы реагентов для иммунологической диагностики паразитарных заболеваний (по группам)															Результат	Дата выдачи результатов исследования	Ф.И.О., подпись лица, проводившего исследования
на гельминтозы										на протозоозы							
Opisthorchis felineus (IgG, IgM, ЦИК)	*Trichinella spiralis* (IgG, IgM)	*Toxocara spp.* (IgG)	*Echinococcus spp.* (IgG)	*Ascaris lumbricoides* (IgG)	*Strongyloides stercoralis (IgG)*	*Schistosoma spp.* (IgG)	*Fasciola hepatica* (IgG)	*Taenia solium* (*Cysticercus cellulosae*) (IgG)	*Другие (указать нозоформу)*	*Lamblia intestinalis (антиген в кале)*	*Toxoplasma gondii* (IgG, IgM, IgA, авидность)	*Leishmania donovani* IgG	*Cryptosporidium parvum (антиген в кале)*	*Entamoeba histolytica* IgG	*Другие (указать нозоформу)*			
14	15	16	17	18	19	20	21	22		24	25	26	27	28		30	31	32

Приложение 2

Протокол проведения иммунологических исследований

_____
(название набора реагентов)

Серия			
Годен до			
Дата исследования			
Опыт №			
№ п/п	№ исследуемого образца	ОП	Результат

/Место наклеивания/

Показатели оптической плотности опытных и контрольных образцов

(данные инструментальных измерений)

Иммунологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней

Методические указания
МУК 4.2.3533—18

Л. С. Кучурова
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 25.09.18

Формат 60x88/16 Печ. л. 3,0
Тираж 100 экз. Заказ 42

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
Федеральным центром гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

gost.e-ecolog.ru