Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Выявление антигена бактерий Legionella pneumophila серогруппы 1 в клиническом материале иммунохроматографическим методом

Методические рекомендации

Издание официальное

Москва • 2010

gost.e-ecolog.ru

4.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Выявление антигена бактерий Legionella pneumophila серогруппы 1 в клиническом материале иммунохроматографическим методом

Методические рекомендации

ББК 51.9
В92

В92 **Выявление** антигена бактерий Legionella pneumophila серогруппы 1 в клиническом материале иммунохроматографическим методом: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.—10 с.

ISBN 978—5—7508—0818—2

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Ф. Лазикова, Ю. В. Демина); ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (И. В. Брагина, М. В. Зароченцев, Э. Ф. Опочинский, И. В. Новокшоновой); ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» РАМН (И. С. Тартаковский, Т. И. Карпова, Ю. Е. Дронина, В. Г. Нестеренко, А. Н. Ловенецкий, О. В. Садретдинова); ФГУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (М. В. Храмов, С. Ф. Бекетов); ГНЦ биологического приборостроения (В. Н. Злобин, С. П. Ярков).

2. Рекомендованы к утверждению Лабораторным советом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 23.09.08).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 9 декабря 2008 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.9

ISBN 978—5—7508—0818—2

© Роспотребнадзор, 2010
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010

Содержание

1. Область применения 4
2. Термины и сокращения 4
3. Общие положения 5
4. Сущность метода 5
5. Техническое оснащение 6
6. Отбор, хранение и транспортирование материала для исследования 7
7. Проведение исследования 7
8. Обработка результатов 9
9. Требования безопасности 9
10. Нормативные ссылки 10

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
9 декабря 2008 г.
№ 01/14633-8-34

4.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Выявление антигена бактерий *Legionella pneumophila* серогруппы 1 в клиническом материале иммунохроматографическим методом

Методические рекомендации

1. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации предлагают методику проведения лабораторной диагностики легионеллеза на основе выявления антигена легионелл иммунохроматографическим методом.

1.2. Методические рекомендации предназначены для применения в лабораториях учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, в лабораториях других организаций, осуществляющих лабораторную диагностику заболеваний верхних и нижних дыхательных путей.

1.3. Предлагаемый метод выявления бактерий *Legionella pneumophila* серогруппы 1 в клиническом материале согласуется с международными стандартами ВОЗ и Европейской рабочей группы по легионеллезу.

2. Термины и сокращения

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения.

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Нозокомиальный легионеллез – инфекционное заболевание легионеллезной этиологии, возникшее в период пребывания в лечебно-профилактической организации (ЛПО) или в течение 10-ти дней после выписки из него, а также связанное с процедурами, проводимыми в ЛПО любого типа.

Спорадический легионеллез – случаи легионеллеза, не связанные с пребыванием или получением процедур в лечебно-профилактической организации, а также с поездками и путешествиями.

3. Общие положения

По данным официальной статистики, среди населения Российской Федерации ежегодно регистрируется до 20 случаев легионеллезной инфекции. Однако современные исследования показывают, что удельный вес этой нозологической формы в общей структуре внебольничных пневмоний занимает порядка 6—14 %. Время диктует необходимость более подробного изучения эпидемического процесса заболевания, которое уже приобрело определенное социальное значение, поражая людей во время путешествий, общественных мероприятий, дома и на работе.

В клинической картине заболевания отсутствуют патогномоничные симптомы. Подозрение на легионеллезную этиологию инфекции возникает в случаях тяжелого течения внебольничной пневмонии при наличии следующих факторов риска: теплое время года, возраст старше 40 лет, мужской пол, путешествие (отдых с выездом, командировка) внутри страны или за рубеж, совпадающее со сроком инкубационного периода (от 2 до 10 дней до начала заболевания), работа в туристических или гостиничных комплексах, занятость на строительных или земляных работах, наличие вредных привычек (курение, алкоголь, наркомания), наличие сопутствующих заболеваний, в первую очередь: диабет, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания, сопровождаемые курсом гормональной или (и) интенсивной иммуносупрессивной терапии.

Легионеллез является серьезной инфекцией, часто приводящей к инвалидизации. Летальность в случаях позднего и неадекватного лечения может достигать 20 %. Поэтому своевременная диагностика патологии приобретает особое значение, как для выбора соответствующей терапии и прогноза течения заболевания, так и для определения причинно-следственной связи формирования эпидемических очагов, организации адекватных санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий.

4. Сущность метода

Метод выявления антигена легионелл в клиническом материале является иммунохроматографическим тестом для быстрого и достоверного подтверждения диагноза легионеллезной инфекции, вызванной *Legionella pneumophila* серогруппы 1. Растворимый антиген выявляется в

моче больных начиная с третьего для болезни и может быть обнаружен в течение нескольких последующих месяцев (до 1 года).

Метод основан на взаимодействии кроличьих антител к *Legionella pneumophila* серогруппы 1, нанесенных на нитроцеллюлозную мембрану с растворимым антигеном возбудителя, выявляемым в достаточно высокой концентрации во время заболевания в моче больного. Кроличьи антитела связаны с красителем, обеспечивающим визуализацию реакции в течении 15—30 мин после нанесения образцов мочи на нитроцеллюлозную мембрану.

Метод входит в международный стандарт (стандарт ВОЗ) диагностики легионеллеза и является базовым. В настоящее время в более 90 % случаев окончательный диагноз внебольничной легионеллезной инфекции в мире устанавливается данным методом. Положительные результаты могут быть дополнены с помощью бактериологического или серологических методов.

Указанный тест используется только для исследования образцов мочи. Для других образцов (сыворотка крови, другие биологические жидкости), которые могут содержать антиген легионелл, метод не является достоверным. Метод в данной модификации также не может быть использован для исследования образцов окружающей среды.

5. Техническое оснащение

Техническое оснащение для диагностики легионеллеза иммунохроматографическим методом включает:

1) набор реагентов (стандартные, зарегистрированные в установленном порядке в Российской Федерации):

- тест-кассеты, содержащие мембрану с нанесенными иммобилизованными в виде отдельных полосок кроличьими антителами к антигену *Legionella pneumophila* серогруппы 1 и козьими антителами против IgG кролика в комбинации с конъюгатом, содержащим кроличьи антитела к антигену *Legionella pneumophila* серогруппы 1, конъюгированные с окрашенными частицами;
- реагент А – на основе цитратно-фосфатного буфера с Твином-20 и азидом натрия;
- тампоны на палочке для отбора образца мочи пациента;
- положительный контрольный тампон, содержащий термоинактивированные *L. pneumophila,* высушенные на тампоне;
- отрицательный контрольный тампон, не содержащий *L. pneumophila;*

2) часы или таймер;
3) стандартный пластиковый контейнер для забора образцов мочи.

6. Отбор, хранение и транспортирование материала для исследования

Образцы мочи для исследования помещают в стандартные пластиковые контейнеры и хранят при комнатной температуре (15—30 °С) не более 24 ч после забора перед постановкой реакции. В случае необходимости образцы могут храниться при температуре 2—8 °С до 14 дней или при –20 °С в течение длительного времени для первичного или повторного исследования. В качестве консерванта может быть использована борная кислота.

Образцы мочи можно пересылать в герметично упакованных контейнерах при температуре 2—8 °С или замороженными. Перед постановкой реакции с использованием быстрых тестов для выявления антигена легионелл в моче охлажденные или замороженные образцы мочи оставляют в лаборатории до достижения комнатной температуры.

7. Проведение исследования

Для проведения теста тампон на палочке погружают в образец исследуемой мочи, вынимают и помещают в тест-устройство. Затем добавляют реагент А из прилагающейся пластиковой капельницы. Устройство закрывают, с тем чтобы привести исследуемый образец в контакт с тест-полоской.

Результаты учитываются спустя 15 мин и интерпретируются по наличию или отсутствию визуально различимых окрашенных линий от розового до пурпурного цвета.

Положительный результат включает выявление двух окрашенных линий в зоне чтения как результата тестирования пациента, так и контрольной линии, в то время как отрицательный результат дает только одну окрашенную контрольную линию. Отсутствие окрашенной контрольной линии вне зависимости от наличия или отсутствия окрашенной линии в зоне чтения результата пациента свидетельствует о недействительности теста.

Контроль качества постановки реакции

Положительный контроль.

Появление окрашенной линии от розового до пурпурного цвета в зоне контрольной линии может рассматриваться в качестве внутреннего контроля надлежащей постановки (проведения) теста. В случае наличия капиллярного потока эта линия всегда проявляется на полоске.

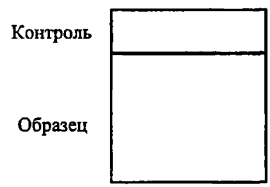
Отрицательный контроль.

Исчезновение фоновой окраски конъюгата в зоне чтения результата анализа пациента предоставляет возможность осуществления отрицательного контроля процедуры постановки теста. Цвет фона в зоне чтения результата теста должен стать от слабо розового до белого в течение 15 мин после постановки и не должен мешать чтению результата теста.

Интерпретация результатов

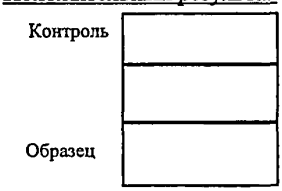
Негативный (отрицательный) образец дает одну окрашенную линию от розового до пурпурного цвета. Эта контрольная окрашенная линия расположена в верхней половине окна чтения результатов, указывая на предположительно отрицательный результат. Наличие этой контрольной линии свидетельствует о том, что процедура постановки теста прошла корректно (правильно), но антиген *L. pneumophila* серогруппы 1 не был обнаружен.

Отрицательный результат



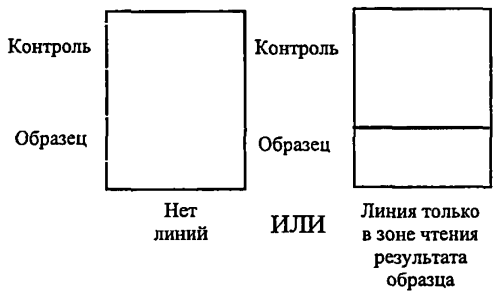
Положительный образец дает две окрашенные линии от розового до пурпурного цвета. Это значит, что антиген был выявлен. Исследуемые образцы с низкими уровнями антигена могут давать слабо окрашенную линию в области чтения результата образца. Любая видимая линия в этой зоне свидетельствует о положительном результате теста.

Положительный результат



В случае отсутствия видимых линий или при наличии одной видимой линии в зоне чтения результата образца результат теста считается недействительным. Недействительный тест должен быть повторен.

Недействительный результат



8. Обработка результатов

Рекомендуемое заключение по результату.

Положительный результат на наличие антигена *L. pneumophila* серогруппы 1 в моче позволяет сделать вывод о наличии текущей или недавно перенесенной инфекции, вызванной данным возбудителем.

Отрицательный результат на наличие антигена *L. pneumophila* серогруппы 1 в моче позволяет сделать вывод об отсутствии недавней или текущей инфекции, вызванной L. pneumophila серогруппы 1.

Отрицательный результат теста не исключает возможность инфекции, вызванной другими серогруппами *L. pneumophila* или другими видами *Legionella species*. Хотя практически все крупные эпидемические вспышки внебольничных пневмоний легионеллезной этиологии и около 90 % спорадических случаев легионеллеза вызваны *Legionella pneumophila* серогруппы 1, при отрицательных результатах теста следует применить бактериологический метод или ПЦР для исследования отделяемого респираторного тракта, бронхоскопии или биопсии больных. При нозокомиальном (внутрибольничном) легионеллезе вероятность этиологической роли других серогрупп *Legionella pneumophila* и других видов *Legionella species* повышается.

9. Требования безопасности

Исследования клинического материала на наличие антигена *Legionella pneumophila* серогруппы 1 иммунохроматографическим методом проводят в соответствии с СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней».

10. Нормативные ссылки

1. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

2. Постановление Правительства Российской Федерации от 24 июня 2000 г. № 554 «Об утверждении положения о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации и Положения о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании».

3. МУ 3.1.2.2412—08 «Эпидемиологический надзор за легионеллезной инфекцией».

4. МУК 4.2.2217—07 «Выявление бактерий Legionella pneumophila в объектах окружающей среды».

5. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и паразитарных болезней».

7. European Guidelines for Control and Prevention of Travel associated Legionnaires Disease, 2002.

8. *Legionella* and the prevention of Legionellosis. WHO guidelines. 2007.

Выявление антигена бактерий Legionella pneumophila серогруппы 1 в клиническом материале иммунохроматографическим методом

Методические рекомендации

Редакторы Н. В. Кожока, Е. В Николаева
Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 05.02.10

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,75

Тираж 500 экз. Заказ 7

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
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

gost.e-ecolog.ru