Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

3.2. ПРОФИЛАКТИКА ПАРАЗИТАРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Серологические методы лабораторной диагностики паразитарных заболеваний

Методические указания
МУ 3.2.1173—02

Издание официальное

Минздрав России
Москва • 2003

gost.e-ecolog.ru

3.2. ПРОФИЛАКТИКА ПАРАЗИТАРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Серологические методы лабораторной диагностики паразитарных заболеваний

Методические указания
МУ 3.2.1173—02

ББК 51.9
С32

С32 **Серологические** методы лабораторной диагностики паразитарных заболеваний: Методические указания.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003.— 36 с.

ISBN 5—7508—0332—5

1. Разработаны: Институтом медицинской паразитологии и тропической медицины им Е И. Марциновского ММА им. И. М. Сеченова (В. П. Сергиев, О. Г. Полетаева, Т. В. Продеус, Э. Е. Шуйкина, Е. А. Коврова, Н. Н. Красовская), кафедра паразитологии, паразитарных и тропических болезней МПФ ППО ММА им. И. М. Сеченова (Т. В. Старкова, Н. А. Романенко), Федеральным центром госсанэпиднадзора Минздрава России (Т. Н. Цыбина, Т. Г. Сыскова, Л. Г. Подунова, Т А. Семенова), Российской Академией последипломного образования (А. Я. Лысенко, Т. Н. Константинова, Т. И. Авдюхина, А. Е. Беляев, М. Г. Владимова), НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалея (А Л. Гинзбург, А. И Грачева), Омским НИИ природно-очаговых инфекций (О. Ю. Старостина, В. К Ястребов), Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии (Ю. И. Васерин, Т. И Твердохлебова), Тюменским НИИ краевой и инфекционной патологии (Г Ф. Степанова, Т. В Постникова, К. Б. Степанова), Всероссийским НИИ гельминтологии им. К И. Скрябина (А В. Успенский, А. С. Бессонов, Н. В. Шеховцов), ЗАО «Вектор-Бест» (А. В Масяго).

2. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко 14 ноября 2002 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.9

Редакторы Акопова Н. Е., Кучурова Л. С.
Технический редактор Ломанова Е. В.

Подписано в печать 30.01.03

Формат 60x88/16 Печ. л. 2,25

Тираж 3000 экз. Заказ 5

Министерство здравоохранения Российской Федерации
101431, Москва, Рахмановский пер., д. 3

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован Издательским отделом Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава РФ
125167, Москва, проезд Аэропорта, 11
Отделение реализации, тел. 198-61-01

© Минздрав России, 2003
© Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003

Содержание

1. Область применения 4
2. Нормативные ссылки 4
3. Отбор проб, хранение и транспортирование материала для серологических исследований. 5
4. Общие сведения о инвазиях, выявляемых серологическими методами 6
4.1. Основные гельминтозы, выявляемые серологическими методами 7
4.2. Основные протозоозы, выявляемые серологическими методами 11
5. Основные принципы проведения серологических методов исследования 14
5.1. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) 14
5.2. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) 15
5.2.1. Принцип постановки РНГА 16
5.3. Иммуноферментный анализ (ИФА) 17
5.3.1. Подготовка к работе 18
5.3.2. Подготовка проб исследуемых сывороток 18
5.3.3. Принцип постановки ИФА 18
5.3.4. Правила работы с ингредиентами тест-систем ИФА 23
5.4. Порядок направления рекламации поставщикам (производителям) диагностических тестов 24
5.5. Лабораторный контроль 25
5.5.1. Внутренний лабораторный контроль 25
5.6. Документальное представление результатов выполнения методик 32
Приложение 1. Примерный перечень оборудования для серологических исследований на паразитарные заболевания 33
Приложение 2. Журнал учета серологических исследований 34
Приложение 3. Контрольный протокол проведения серологических исследований 36

МУ 3.2.1173—02

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный
санитарный врач Российской
Федерации – Первый заместитель
Министра здравоохранения
Российской Федерации

Г. Г. Онищенко
14 ноября 2002 г.
МУ 3.2.1173—02
Дата введения: 1 февраля 2003 г.

3.2. ПРОФИЛАКТИКА ПАРАЗИТАРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Серологические методы лабораторной диагностики паразитарных заболеваний

Методические указания

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают основные методы серологической диагностики паразитарных заболеваний, проводимые аккредитованными, лицензированными лабораториями лечебно-профилактических учреждений, органов и учреждений государственной санитарно-эпидемиологической службы, ведомственных учреждений, научно-исследовательских учреждений и других диагностических (испытательных) лабораторий вне зависимости от ведомственной принадлежности и форм собственности.

1.2. Методические указания предназначены для специалистов лабораторий, выполняющих серологические исследования на паразитарные заболевания и использующих медицинские иммунобиологические препараты (МИБП) отечественного и зарубежного производства, зарегистрированные на территории Российской Федерации и разрешенные к применению Министерством здравоохранения Российской Федерации.

2. Нормативные ссылки

• Федеральный закон Российской Федерации «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» № 52-ФЗ от 30.03.99.

• Положение о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации, утвержденное постановлением Правительства РФ № 554 от 24.07.00.

• Положение о санитарно-эпидемиологическом нормировании, утвержденное постановлением Правительства РФ № 554 от 24.07.00.

• СанПиН 3.2.569—96 «Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации».

• СП 3.1/3.2.558—96 «Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний».

• СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

• СП 3.3.2.561—96 «Государственные испытания и регистрация новых лекарственных иммунологических препаратов».

• ОСТ 91 500.05.001—00 «Стандарты качества лекарственных средств».

• МУ 2.1.4.1057—01 «Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды».

3. Отбор проб, хранение и транспортирование материала для серологических исследований

Материалом при иммунологических исследованиях может быть биологический материал от людей (сыворотка крови, слюна, фекалии), а также материал из объектов окружающей среды (почва, вода и др.).

Для выявления антител к антигенам гельминтов и простейших у людей иммунологическими методами в настоящее время используется сыворотка крови обследуемого человека.

3.1. Забор крови на исследование проводится по общепринятым гематологическим методикам (забор венозной крови проводят в процедурных кабинетах лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ), капиллярной крови – в диагностических лабораториях ЛПУ и других аккредитованных лабораториях).

3.2. Подготовка сыворотки проводится в лабораториях.

3.2.1. Кровь в пробирке отстаивают в течение 1—2 ч при комнатной температуре или 0,5—1 ч при 37 °С в термостате, предварительно отслоив стерильной пастеровской пипеткой или стеклянной палочкой сгусток от краев пробирки. Для лучшей ретракции сгустка пробирку помещают в холодильник при 4 °С на 1—2 ч или центрифугируют 10 мин при 3 000 об./мин или 20 мин при 1 500 об./мин. Сыворотку отсасывают стерильной пипеткой в стерильные стеклянные

пробирки (ампулы, флаконы) или полистироловые микропробирки типа «Эппендорф» с крышками.

При массовых обследованиях населения ампулы с сывороткой перед транспортированием и хранением запаивают, избегая нагревания сыворотки, флаконы закрывают стерильными резиновыми пробками, микропробирки закрывают крышками. Ампулы, флаконы, микропробирки нумеруют согласно приложенному списку больных (обследуемых) или этикетируют с указанием фамилии, имени, отчества больного, даты взятия крови.

3.3. Хранение, транспортирование крови и сыворотки.

Кровь доставляется в лабораторию в день взятия. В этот же день из нее должна быть подготовлена сыворотка, которая может храниться до исследования в холодильнике при 2—4 °С не более 4—6 дней. При длительном хранении (более 2-х недель) сыворотку необходимо хранить в замороженном виде при температуре – 20—25 °С, допускается глубокое замораживание до – 70 °С. Не допускается замораживание и размораживание сыворотки более 1 раза.

Длительное хранение сывороток приводит к частичной потере активности антител, особенно иммуноглобулинов класса М (IgM).

При массовом заборе крови от населения, при длительном хранении сывороток до исследования (в течение года) и с целью предупреждения потери активности антител, необходимо хранить сыворотки в глубоком холоде, при температуре не выше – 20—40 °С.

До замораживания сыворотку от одного обследуемого можно разлить в несколько полистироловых микропробирок с крышками типа «Эппендорф», что позволяет размораживать не всю сыворотку, а ее отдельную часть.

Транспортирование замороженных сывороток должно быть при тех же температурных условиях, не допускающих размораживания (в сумках-холодильниках или термосах со льдом, можно использовать сухой лед).

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

4. Общие сведения о инвазиях, выявляемых серологическими методами

В клинической практике серологические методы исследования являются дополняющими к комплексу клинико-инструментальных (эхинококкозы, цистицеркоз, токсокароз) и паразитологических (описторхоз, трихинеллез) показателей для целей дифференциаль-

ной диагностики паразитарного заболевания от заболевания со сходной клинической картиной. Серологическая диагностика применяется с целью выявления инвазированных, для оценки эффективности специфической терапии инвазированных, выявления рецидива заболевания.

4.1. Основные гельминтозы, выявляемые серологическими методами

Трихинеллез. Возбудитель нематода Trichinella spiralis и ее вариитеты. Острое заболевание, сопровождающееся лихорадкой, развитием отеков, миалгией и эозинофилией крови. При тяжелом течении возможно поражение миокарда, центральной нервной системы. Серологическая диагностика трихинеллеза осуществляется с учетом штаммовых особенностей возбудителя заболевания, а также состояния иммунной системы инвазированного. Выработка специфических антител происходит в период миграции личинок трихинелл и концентрации их в мышцах. Их выявление в серологических реакциях у лиц, заразившихся при употреблении в пищу мяса домашних животных (свиньи) с высокой или средней интенсивностью инвазии трихинеллами (200—500 личинок на 1 г мяса) происходит на 15—20 сутки после заражения. При меньшей интенсивности инвазии сроки выявления антител удлиняются. При заражении людей от диких животных (медведь, кабан, барсук, нутрия) антитела выявляются спустя 4—6 недель. В течение 2—4 месяцев показатели серологических 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 и более лет.

Для ранней серологической диагностики трихинеллеза желательна одновременная постановка двух серологических реакций, например, одновременно реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и иммуноферментного анализа (ИФА). Совпадение их результатов свидетельствует о правильности диагноза.

Чувствительность ИФА и РНГА достигает 90—100 %, а специфичность – 70—80 %. Результаты двух реакций совпадают в 80—90 % случаев. Ложноположительные результаты анализа чаще наблюдаются при острой фазе ряда гельминтозов (описторхоз, клонорхоз и др.), в связи с чем для дифференциального диагноза требуется тщательное изучение клинико-эпидемиологического анамнеза. Серологический диагноз трихинеллеза ставится на основании 4-кратного прироста титра антител. При невозможности исследования сыворотки в начале заболевания, исследуется сыворотка крови, полученная в период реконвалесценции. У больных с подозрением

на трихинеллез, при первичном получении отрицательного или сомнительного результата реакции, исследование крови необходимо повторить через 10—14 дней, нарастание титров подтверждает инвазию трихинеллами.

Специфическая терапия трихинеллоцидными препаратами вызывает подъем титров антител, которые сохраняются в диагностических значениях на протяжении 6—12 месяцев, а затем снижаются. У лиц с подозрением на трихинеллез и получавших превентивное лечение серологическое обследование проводят через 2—3 недели после лечения. У переболевших трихинеллезом антитела сохраняются в течение длительного времени – от 2-х и более лет.

При массовых обследованиях населения на трихинеллез сыворотки крови исследуют в одном диагностическом разведении методом скрининга, как указывается в инструкциях к тест-системе ИФА и диагностическому набору РНГА. В случае положительного результата анализа у обследованных и при наличии у них клинической картины трихинеллеза, сыворотку титруют в последовательных двукратных разведениях, начиная от диагностического.

Показания к серологическому обследованию:

• наличие клинических симптомов (лихорадка неясного генеза, отек лица, миалгия, эозинофилия и др.); при миокардитах, менингоэнцефалитах неясного генеза, при лейкемоидной реакции по эозинофильному типу неясного генеза у пациентов, употреблявших в пищу свинину, медвежатину, кабана и мясо других животных – потенциальных хозяев трихинелл;

• расшифровка случаев групповой заболеваемости трихинеллезом (вспышки) и выявление контактных на эндемичных территориях (на неэндемичных территориях: при наличии в эпиданамнезе указаний на употребление в пищу мяса и мясопродуктов из свинины, медвежатины и других животных – потенциальных хозяев трихинелл).

Описторхоз. Возбудитель трематода Opisthorchis felineus. Трематодоз печени, протекающий на ранней стадии в виде острого аллергоза с высокой эозинофилией крови, на поздней – с преимущественным поражением гепатобилиарной системы, с умеренно повышенным или нормальным уровнем эозинофилов.

Серологическая диагностика описторхоза на ранней фазе заболевания, до начала яйцепродукции паразитом, является единственным методом лабораторной диагностики, при хроническом описторхозе является вспомогательным методом, при котором требуется подтверждение паразитологическими методами диагностики. Чувствительность реакции (ИФА и РНГА) в острую фазу прибли-

жается к 100 %, в хронической фазе заболевания – до 70 %, и зависит от интенсивности инвазии. Ложноположительные результаты анализа возможны при исследовании сыворотки здоровых лиц в 1,0 %, больных непаразитарными заболеваниями (аллергозы, патология желудочно-кишечного тракта, гепатобиллиарной 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.

В очагах описторхоза у коренных жителей наблюдаются низкие показатели серологических реакций вследствие врожденной толерантности. У пришлого населения (рабочие-вахтовики, переселенцы и др.) вследствие отсутствия врожденной невосприимчивости к заражению описторхисами, как правило, регистрируются высокие показатели серологических реакций.

При серодиагностике возможно получение ложноотрицательных результатов на фоне иммунодефицитных состояний вследствие сопутствующих хронических заболеваний или индуцированных приемом медикаментов (антибиотиков, глюкокортикостероидов, химиопрепаратов).

Показания к серологическому обследованию:

- высокая эозинофилия крови или лейкемоидная реакция по эозинофильному типу у лиц, употреблявших в пищу речную рыбу;
- лица, работавшие или проживавшие в эндемичных по описторхозу районах, а в настоящее время страдающие заболеваниями желчевыводящих путей.

Эхинококкозы. Возбудитель однокамерного эхинококкоза – личиночная форма цестоды Echinococcus granulesus, многокамерного эхинококкоза – Echinococcus multilocularis. Тяжелые, хронически протекающие гельминтозы с поражением печени и других органов, приводящие в части случаев к инвалидизации и летальным исходам.

Серологические реакции при эхинококкозах используют для первичной диагностики, для оценки результатов оперативного и консервативного лечения и наблюдения за больными в динамике, для раннего выявления рецидивов заболевания. Локализация и жизнеспособность ларвоцист эхинококка гидатидозного и альвеолярного, интенсивность инвазии, а также состояние иммунной системы хозяина влияют на интенсивность антителообразования и выявляемость инвазированных с помощью серологических реакций.

Наиболее эффективными для диагностики эхинококкозов являются реакции РНГА и ИФА, с помощью которых выявляются до 90—98 % инвазированных, независимо от видовой принадлежности паразита. Совпадение двух реакций наблюдается в 90 % случаев.

Максимальная выявляемость эхинококкозов серологическими методами (до 98 %) наблюдается при локализации эхинококковых пузырей живого паразита в печени, брюшной полости и забрюшинном пространстве, а также при множественном и сочетанном поражении. При поражении легких, а также при наличии 1—3 кист небольшого (до 2 см) размера эффективность серологической диагностики ниже и колеблется в пределах 70—80 %. Наименее информативны серологические методы диагностики при эхинококкозе нервной (спинной или головной мозг, глаз), мышечной или костной ткани, а также при погибшем и обызвествленном паразите. В этом случае чувствительность диагностических препаратов не превышает 40 %. При серологической диагностике эхинококкозов возможна регистрация ложноположительных результатов, возникающих при наличии в крови неспецифических антител, сходных по структуре с антителами к эхинококку. Наиболее часто ложноположительные результаты выявляются при соматических и инфекционных заболеваниях, сопровождающихся обширными деструктивными процессами в пораженных органах (цирроз печени, туберкулез легких и других тканей, онкологические заболевания). Возникновение ложноположительных реакций возможно при других гельминтозах (описторхоз, фасциолез и цистицеркоз).

Низкие титры антител могут быть выявлены в ранний период болезни (кисты диаметром до 2 см), а также при обызвествленных оболочках личинок; резкое снижение титров может наблюдаться при далеко зашедшем процессе, в поздней, неоперабельной стадии эхинококкозов. Высокие титры антител могут быть выявлены у больных с активным процессом, чаще локализованном в органах брюшной полости; в случае легочной локализации кисты эхинококка (даже при наличии кисты больших размеров) титры антител могут быть низкими.

Показания к серологическому обследованию:

- наличие объемного образования или кист в печени и других органах;
- эпидзначимые контингенты – лица, относящиеся к группам риска (охотники и члены их семей; зоотехники; чабаны и пастухи; работники кожевенных предприятий т. д.), лица, проживающие в очагах эхинококкозов.

Токсокароз – вызывается мигрирующими личинками аскаридат собак Toxocara canis. Инвазия с длительным рецидивирующим течением, полиморфными клиническими проявлениями и высокой эозинофилией периферической крови.

Серологическая диагностика токсокароза основана на результатах реакции ИФА с антигеном токсокар при исследовании сыворотки крови у лиц с характерным комплексом симптомов: лимфаденопатия, гепатомегалия, бронхит, бронхиальная астма неясного генеза, уртикарная сыпь на фоне эозинофилии крови, лейкемоидная реакция эозинофильного типа с характерным эпиданамнезом (например: геофагия) и др.

У пациентов, имеющих симптоматику, характерную для токсокароза, титры антител (АТ) в ИФА 1 : 800 и выше подтверждает клинический диагноз. У лиц при отсутствии клинической симптоматики титр АТ в ИФА 1 : 400 и ниже свидетельствует о контакте человека с возбудителем без развития патологического процесса. Ложноположительные результаты анализа могут наблюдаться у лиц с системными лимфопролиферативными заболеваниями и нарушениями в системе иммунитета. Это определяет необходимость проведения анализа клинической картины заболевания. Ложноотрицательный и сомнительный результат анализа может наблюдаться у лиц с поражением токсокарами глаз в результате слабого антигенного воздействия. Лиц с низким положительным результатом ИФА (титр 1 : 200—1 : 400) ставят на диспансерный учет и каждые 3 месяца проводят серологическое исследование. При появлении клинической картины заболевания и повышения титров специфических АТ, врач принимает решение о необходимости проведения лечебных мероприятий.

4.2. Основные протозоозы, выявляемые серологическими методами

Токсоплазмоз. Возбудитель внутриклеточные простейшие Toxoplasma gondii. Широко распространенное протозойное заболевание, характеризуется полиморфизмом клинических проявлений от бессимптомного носительства до выраженных клинических проявлений. Серологическая диагностика токсоплазмоза осуществляется с помощью ИФА для выявления IgM- и IgG-антител и реакции иммунофлюоресценции (РИФ). Является важной для дифференциальной диагностики от заболеваний со сходной клинической картиной. Сроки выявления специфических антител и кинетика смены концентраций иммуноглобулинов обоих классов индивидуальны, и зависят от интенсивности инвазии и иммунного статуса инвазированных. В ряде случаев выявление иммуноглобулинов класса IgM в РИФ и ИФА наблюдается через 7—12 суток после заражения в невысоких титрах. Через 2—3 месяца эти показатели достигают максимума, а через 3—4 месяца исчезают. Концентрация антител, относящихся к

иммуноглобулинам класса IgG, достигает максимума к концу 2 месяца инвазии, затем снижается, но остается повышенной в течение всей жизни инвазированного.

Рекомендуется повторное обследование лиц с положительными титрами на токсоплазму через 10—14 суток, для установления динамики развития болезни. Отсутствие увеличения титров антител свидетельствует о хроническом токсоплазмозе. Увеличение титров на 3—4 разведения сыворотки свидетельствует об активном течении инвазии. Возможна иная схема кинетики выявления в РИФ и ИФА иммуноглобулинов классов М и G.

Высокие титры IgM свидетельствуют об острой стадии болезни. Высокие титры IgG могут свидетельствовать об обострении хронической инфекции, если есть клинические проявления, характерные для токсоплазмоза. Низкие титры IgG указывают на субклиническую, латентно протекающую инфекцию. Повышение и понижение титров антител можно считать достоверными, если разница предыдущего и последующего исследования различается по крайней мере на 4 разведения.

Показания к обследованию на токсоплазмоз:

- беременные женщины по показаниям, с сероконверсией;
- больные токсоплазмозом, получающие специфическое лечение;
- дети, рожденные от матерей с отягощенным анамнезом по токсоплазмозу;
- эпидзначимые контингенты: ветеринарные и другие специалисты, связанные в работе с кошками и собаками;
- больные с клиническими проявлениями, характерными для токсоплазмоза.

Амебиаз. Возбудитель Entamoeba histolytica.

Серологическая диагностика позволяет подтвердить внекишечный амебиаз, при котором паразитологическая диагностика невозможна. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) обладает высоким диагностическим потенциалом при выявлении этой инфекции за счет высокой чувствительности, специфичности и воспроизводимости.

Определение специфических антител в РИФ с амебным антигеном имеет принципиальное значение для уточнения этиологии процесса с локализацией поражений в толстом кишечнике; при проведении дифференциальной диагностики заболеваний, клинически сходных с амебным абсцессом печени (ААП), особенно для больных, прибывших или вернувшихся из стран жаркого или тропического пояса. Серологические исследования особенно ценны при выявлении внекишечных форм амебиаза: 98—100 % клинически выра-

женного ААП. Реакция иммунофлюоресценции дает положительный результат в 75—80 % случаев инвазивного амебиаза кишечника, особенно при молниеносном колите, амебоме и перитоните. При интерпретации результатов РИФ следует учитывать, что титр 1 : 320 и выше свидетельствует, как правило, о клинически выраженной, чаще внекишечной форме амебиаза. В титре 1 : 80—1 : 160 реакция может быть положительной у больных амебиазом в момент обследования или переболевших в недавнем прошлом, а также в случае вялотекущих, стертых форм кишечного амебиаза. РИФ в титре 1 : 40 может быть положительна у лиц с симптомами кишечного амебиаза при соответствующем эпиданамнезе и неотягощенном статусе больного. В этом случае эффективно исследование парных сывороток, т. к. подъем уровня антител после лечения, безусловно, свидетельствует в пользу амебной этиологии процесса. Ложноположительный результат в титре 1 : 40 может быть зарегистрирован у больных с системным аутоиммунным и онкопроцессом (III—IV стадии). Реакция иммунофлюоресценции в низких титрах (1 : 20—1 : 40) позволяет выявить среди зараженных бессимптомных носителей возбудителя амебиаза. Последовательное неуклонное снижение у переболевших уровня антител ниже 1 : 20 – показатель эффективности лечения в противном случае подъем титров и появление клинических симптомов следует оценивать как рецидив болезни.

При амебиазе реакция иммунофлюоресценции используется для подтверждения клинического диагноза, наблюдения за динамикой заболевания и последствий инфекции, вызванной дизентерийной амебой, при эпиднадзоре.

Отечественные тест-системы на амебиаз находятся в стадии разработки.

Лямблиоз. Возбудитель Lamblia intestinalis

В настоящее время на лямблиоз предприятиями бакпрепаратов выпускаются отечественные диагностические тест-системы как экспериментальные для проведения иммуноферментного анализа сыворотки крови. Имеются зарубежные диагностические тест-системы, в т. ч. для определения лямблиозных антигенов в фекалиях.

Антитела к антигенам лямблий проявляются на 10—14 день после начала инвазии и присутствуют в крови и секретах человека практически на всех ее стадиях. Через 1—2 месяца после полной элиминации паразита концентрация специфичных IgG в крови человека резко снижается.

5. Основные принципы проведения серологических методов исследования

5.1. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

Иммунофлюоресцентный метод (непрямой вариант) представлен двухэтапной реакцией, при которой обнаружение искомого антитела в комплексе антиген—антитело (АГ—АТ) (1 этап) происходит с помощью конъюгата – антиглобулина, гомологичного по отношению к белкам иммунной сыворотки, меченного флюоресцеинизотиоцианатом. Добавление конъюгата не обязательно для выявления комплекса АГ—АТ при наблюдении в люминесцентном микроскопе. В диагностический набор для РИФ входит: антигенный препарат (специально размеченные предметные стекла с зафиксированной на их поверхности взвеси корпускулярного антигена), контрольные положительная и отрицательная сыворотки, люминесцирующая антивидовая сыворотка и реагенты.

Принцип проведения реакции иммунофлюоресценции (непрямой вариант)

- Подготовка растворов.
- Титрование испытуемых сывороток и их контрольных образцов.
- Нанесение подготовленных разведений испытуемых и контрольных образцов сывороток на специально размеченные предметные стекла с антигеном.
- Инкубация препаратов с образцами во влажной камере (время и температура согласно инструкции.
- Отмывание препаратов в трех сменах фосфатно-солевого буфера (ФСБ) от непрореагировавших компонентов сыворотки.
- Высушивание препаратов на воздухе.
- Нанесение люминесцирующей антисыворотки (конъюгата) в рабочем разведении на стекла с антигеном.
- Инкубация препаратов во влажной камере при комнатной температуре.
- Отмывание препаратов в трех сменах ФСБ от непрореагировавших компонентов флюоресцирующей антисыворотки.
- Высушивание на воздухе.
- Нанесение препаратов на предметное стекло в забуференный глицерин под покровные стекла.
- Микроскопирование препаратов в люминесцентном микроскопе.

Результаты реакции оценивают по наличию и интенсивности поверхностного зеленовато-желтого свечения клеток антигена по 4-балльной системе:

• 3—4 креста – яркая флюоресценция зеленого цвета по периферии клетки токсоплазм, четко контрастирующая с телом клетки;

• 2 креста – слабое, но явно зеленое свечение периферии клетки,

• 1 крест – очень слабое свечение периферии клетки, не контрастирующее с телом клетки.

Отсутствие свечения клеток и их границ «ободка» в отрицательном контроле при ярком флюоресцировании «ободка» клеток, обработанных положительной контрольной сывороткой, подтверждает надежность проводимого исследования.

За титр реакции принимают то разведение сыворотки, в котором 50 % и более клеток антигена в каждом изученном поле зрения имеют четкое специфическое поверхностное свечение. Значение диагностического титра – 1/80—1/100.

5.2. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Реакция непрямой гемагглютинации основана на способности эритроцитов адсорбировать на своей поверхности антиген и при контакте со специфическими антителами склеиваться и образовывать осадок, видимый невооруженным глазом.

Она рекомендуется для диагностики описторхоза в острой фазе, трихинеллеза и эхинококкоза в острой и хронической фазах заболевания рекомендуется РНГА. Метод обладает высокой чувствительностью (до 90—98 %) в острой фазе описторхоза, трихинеллеза и хронической – трихинеллеза и эхинококкоза. В хронической фазе описторхоза чувствительность РНГА не превышает 45 %.

Реакцию непрямой гемагглютинации можно использовать в качестве теста, дополняющего результаты иммуноферментного анализа, для повышения достоверности серологической диагностики гельминтозов.

Диагностический набор содержит: формалинизированные эритроциты барана, сенсибилизированные специфическим антигеном (Д+), эритроциты барана без антигена (Д–), сыворотка диагностическая агглютинирующая, положительный контрольный тест (К+), сыворотка нормальная человека – отрицательный контрольный тест (К–), эритроциты барана сухие (Э), реагент для приготовления раствора для разведения сывороток.

5.2.1. Принцип постановки РНГА

Проведение реакции непрямой гемаглютинации с использованием промышленных препаратов включает следующие этапы, которые должны точно соответствовать инструкции по применению используемого препарата:

1) подготовка растворов, необходимых для проведения анализа;

2) подготовка испытуемых сывороток и контрольных сывороточных образцов;

3) нанесение на планшет испытуемых и контрольных образцов;

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

5) инкубация;

6) учет результатов.

Результаты анализа учитываются в титрах и по интенсивности реакции, выраженной в крестах. При оценке результата реакции по 4-крестной системе учитывается характер осадка эритроцитов на дне лунок:

• резко интенсивная реакция (++++) – все эритроциты агглютинированы и покрывают дно лунок, образуя «зонтик»;

• интенсивная реакция (+++) – агглютинированы почти все эритроциты, образуя зонтик, в центре которого имеется заметное кольцо из осевших неагглютинированных эритроцитов;

• реакция средней интенсивности (++) – на дне лунки различается осадок из неагглютинированных эритроцитов в виде плотного широкого кольца;

• реакция слабой интенсивности (+) – мелкие агглютинаты на дне лунки, большинство эритроцитов не агглютинировало и осело в центре лунки в виде маленького кольца;

• реакция отрицательная (–) – эритроциты осели на дне лунки, образуя «пуговку» или маленькое колечко с ровными краями.

Учет проводится при соответствующих показателях контролей:

Д+ – не образует спонтанной агглютинации в отсутствии сывороток, с К– – не агглютинируют в разведении выше диагностического титра, с К+ – агглютинируют (см. инструкцию по применению).

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

Титром сыворотки считают последнее разведение, при котором наблюдается четкая агглютинация не менее чем на 3 креста (+++). Диагностические титры реакции с эритроцитарными диагностикумами указаны в инструкции по применению.

5.3. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Реакция иммуноферментного анализа (ИФА) основана на специфическом взаимодействии антигена и антитела с предварительной иммобилизацией (фиксацией) одного из компонентов реакции (антигена или антител) на твердофазном носителе (в лунках полистироловых планшетов, стрипов и др.) и выявления образовавшегося комплекса АГ—АТ посредством ферментной метки (конъюгат). Выявление образовавшегося комплекса осуществляется по изменению интенсивности окраски (оптической плотности) субстратной смеси, содержащей вещество, с которым реагирует фермент, и индикатор, изменяющий цвет под действием продуктов реакции фермент—субстрат.

Реакция ИФА обладает рядом преимуществ перед другими серологическими тестами, которые состоят в следующем:

- высокой специфичности и чувствительности;
- возможности использования универсальных реагентов и отконтролированных диагностических тест-систем; высокая стабильность реагентов (не менее 6 месяцев);
- возможность стандартизации проведения анализа и учета его результатов за счет автоматизации процесса.

В используемых в медицинской практике на территории России тест-системах ИФА участвует 3 компонента: антиген паразита, специфические антитела исследуемой сыворотки крови и конъюгат (меченные ферментом антивидовые антитела или протеин А стафилококка).

Реакцию АГ—АТ с коньюгатом выявляют путем введения в состав субстратной смеси одного из хромогенов: ортофенилендиамина (ОФД), 5-аминосалицидовой кистолы (5-АС) или тетраметилбензидин (ТМБ).

Учет результатов при использовании 5-АС и ОФД проводят по оптической плотности при длине волны 492 нм, а при использовании ТМБ – при 450 нм на сканирующем спектрофотометре типа Мультискан, Униплан, Биоскрин, Стат-Факс и т. п. При отсутствии прибора автоматического измерения оптической плотности возможен визуальный учет результатов анализа по интенсивности цветовой окраски раствора в тех случаях, когда это предусмотрено инструкцией по применению.

Диагностический набор (тест-система) включает:

- твердофазный носитель с адсорбированным на нем специфическим антигеном паразита;

• контрольные тест-сыворотки (диагностические, отрицательные и положительные) для определения правильности хода реакции и оценки результатов анализа;

• основные ингредиенты для приготовления растворов, используемых в ходе реакции.

5.3.1. Подготовка к работе

Режим работы лаборатории, выполняющей серологические исследования на паразитарные заболевания, должен соответствовать СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

Все исследуемые образцы сывороток крови следует считать потенциально инфицированными, независимо от результатов тестов, которые провел производитель тест-системы.

5.3.2. Подготовка проб исследуемых сывороток

Подготовку сыворотки крови проводить в соответствии с п. 3 (п.п. 3.2). Сыворотку во избежание гемолиза крови следует отбирать не позже чем через 2 ч после взятия крови. Тест-системы отечественного производства и некоторые импортные наборы чувствительны к наличию гемолиза в пробе и вследствие этого могут давать ложноположительные результаты. При приготовлении сывороток должны быть приняты все меры, позволяющие исключить их контаминацию.

5.3.3. Принцип постановки ИФА

Проведение иммуноферментного анализа с использованием промышленных диагностических препаратов включает следующие этапы, которые должны точно соответствовать инструкции по применению используемого препарата:

1. Подготовка растворов, необходимых для проведения анализа

• Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ), состоящий из солей и твина. Этот раствор используется как отмывающий в ходе реакции и для приготовления раствора для разведения сывороток. Состав солей и навески для приготовления раствора ФСБ определены в инструкции. В большинстве тест-систем раствор ФСБ прилагается в концентрированном виде, и для приготовления рабочего раствора требуется только разведение дистиллированной водой до объема, указанного в инструкции.

• Раствор для разведения контрольных и испытуемых сывороток готовится на рабочем растворе ФСБ (см. инструкцию по применению).

Разведение всех ингредиентов (сыворотка, конъюгат, субстратная смесь и др.) и объемы их внесения в планшет должны соответствовать инструкции по применению.

2. Подготовка испытуемых сывороток и контрольных образцов

• Если тест-система укомплектована контрольными сыворотками в рабочем разведении, то они не требуют дополнительных разведений. При укомплектации тест-систем контрольными сыворотками (отрицательной, положительной, диагностической) в сухом виде или исходными растворами – необходимо приготовить рабочие разведения, в концентрациях, указанных в инструкции или непосредственно на флаконах.

Подготовленные испытуемые сыворотки разводят раствором для разведения сывороток в отдельных планшетах. Нельзя применять для предварительного разведения сывороток неиспользованные планшеты из наборов с сорбированными антигенами или антителами. Разведенные сыворотки хранению не подлежат.

Для получения рабочих разведений в соотношениях, которые указываются в инструкции. Например: 1 : 100 или 1 : 200, т. е. к 100 или, во втором случае, к 200 частям раствора для разведения сыворотки добавляется 1 часть нативной сыворотки обследуемого.

Если сыворотки испытуемой или контрольной взяли объем, равный 0,01 мл, то при разведении 1 : 100 необходимо взять 1 мл раствора для разведения сыворотки (0,01 мл × 100 частей = 1,0 мл), а при разведении 1 : 200 необходимо взять 2 мл раствора для разведения сыворотки (0,01 мл × 200 частей = 2 мл).

Приготовление рабочих растворов контрольных сывороток тест-ситемы (К+, К–, $К_л$) требуется только в тест-системах, где это указано в инструкции.

Следует учитывать, что сыворотки и типичные разводящие растворы для сывороток могут различаться по плотности и вязкости. Поэтому при приготовлении разведений их следует тщательно перемешать пипетированием.

3. Нанесение на планшет испытуемых и контрольных образцов

При скрининге сыворотки исследуют в одном диагностическом разведении, внося их во все лунки планшета, кроме одной (контроль конъюгата).

Следует убедиться в том, что исследуемый образец или реагент внесен в лунку.

Испытуемые и контрольные образцы сывороток вносят в соответствии с протоколом исследования (см. прилож. 3).

При тестировании проб сывороток в последовательных двукратных разведениях (титрование) их разводят на том же растворе во вспомогательных рядах пробирок или лунок планшетов для микротитрования. Контрольные образцы (К+, К–) вносят без растительровки.

Реакция связывания антител с антигенами начинается сразу после внесения сыворотки в лунку, поэтому желательно уменьшить период между внесением первой и последней сывороток на планшет. В случае длительного времени внесения образцов (например, постановка цельного планшета) рекомендуется перестановка сывороток, дающих оптическую плотность в ближайшем к серой зоне районе оптических плотностей.

Если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов (например, 2 сыворотки внесены в одну лунку), нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец – такая лунка бракуется.

4. Инкубация

Планшет закрывается крышкой и инкубируется при температуре и сроке в соответствии с инструкцией по применению.

5. Промывка

Несвязавшиеся компоненты сыворотки удаляют из лунок планшета отсасыванием или вытряхиванием в дезраствор. Отмывка оставшихся в лунках несвязавшихся компонентов сыворотки осуществляется рабочим раствором ФСБ. При этом заполняют лунки до краев, не переливая через край, количество промывных циклов регламентируется инструкцией по применению. Равномерность заполнения и опорожнения всех лунок планшета, а также отсутствие пузырьков воздуха контролируют визуально в процессе промывки.

6. Внесение конъюгата

Внесение конъюгата в лунки планшета (стрипа) производится в рабочем разведении и объеме, соответствующем инструкции по применению.

Инкубацию планшетов (стрипов) с конъюгатом проводят в соответствии с инструкцией по применению. После чего несвязавшийся конъюгат удаляется и проводится промывка лунок, как указано выше.

7. Нанесение субстратной смеси

Рабочий раствор субстратной смеси готовится непосредственно перед использованием (следует исключить воздействие прямого солнечного света) и вносится в лунки в объеме, предусмотренном инструкцией по применению.

Завершающий этап реакции – выдерживание внесенного рабочего раствора субстрата на планшете (стрипе) в темном месте (или сверху закрыть темной бумагой) при комнатной температуре до полного

развития окраски при АСК в качестве хромогена или определенное время (указанное в инструкции) при использовании ОФД или ТМБ.

Перед учетом результатов реакцию останавливают внесением в планшет стоп-реагента, если это предусмотрено инструкцией по применению.

8. Учет результатов

Учет результатов проводится инструментально с помощью приборов измерения (типа: «Мультискан», «Униплан», «Биоскрин», «Стат-Факс» и др.) с длиной волны оптической плотности 492 нм или 450 нм или визуально. Визуальный учет результатов анализа возможен в тех случаях, когда это предусмотрено инструкцией по применению.

Оценку результатов проводят только в том случае, если окраска субстратной смеси в лунках с положительным контрольным образцом имеет интенсивное окрашивание, а в лунках с отрицательным контрольным образцом и контролем конъюгата (без сыворотки) – бесцветная или слабо-окрашенная и (или) регистрируемая оптическая плотность (ОП) в лунках с контрольными образцами должна соответствовать таковым, определяемым инструкцией по применению.

При визуальном учете результатов реакции положительной считают исследуемую сыворотку, если обусловленная ею окраска субстратной смеси более интенсивная, чем в лунках с диагностическим контролем ($К_д$) на стрипах с этим же антигеном. При инструментальном учете положительно реагирующей с антигеном считают сыворотку, если ее значение ОП в начальном разведении (определяемое согласно инструкции) превышает значение ОП диагностического контроля в том же разведении на стрипах с этим же антигеном.

Скрининг

Исследуемую сыворотку считают положительной, если значение ее ОП в диагностическом разведении равно или превышает значение диагностического уровня (ДУ):

- $ОП_{К-}$ в 2—3 раза;
- ОП, вычисленного по приведенной в инструкции расчетной формуле диагностического уровня;
- $ОП_{Кд}$.

Существует метод учета концентрации специфических антител, выраженный в международных единицах (МЕ/мл), в этом случае оценку результатов проводят по калибровочной кривой, построенной по результатам ОП стандартных, приложенных к тест-системе тест-образцов с определенной концентрацией АТ, выраженной в МЕ/мл.

Другой метод определения концентрации специфических антител предложен Всемирной организацией здравоохранения 1987 г. В этом случае концентрация выражается в антительных единицах (АЕ). Формула расчета АЕ следующая:

$$АЕ = (ОП_{исп} - ДУ/ОП_{К+} - ДУ) \cdot 100, \text{ где}$$

$ОП_{исп}$ – ОП испытуемой сыворотки,

ДУ – ОП диагностическая,

$ОП_{К+}$ – ОП контрольного положительного образца.

Растипровка

При определении титра антител за титр принимают то наибольшее ее разведение, при котором значение ОП равно или превышает значение ОП диагностического уровня по инструкции. В ряде случаев титр сыворотки определяют по ее разведению, при котором показатель ее ОП превышает в 2—3 раза $ОП_{К-}$ в диагностическом разведении, что определяется инструкцией по применению.

Следует учитывать, что реакция окисления ОФД при добавлении серной кислоты до конца не останавливается. Поэтому измерять оптическую плотность в лунках необходимо не позднее чем через 30 мин после добавления серной кислоты в качестве стоп-реагента.

Если в инструкции по применению не введено понятие «серой зоны», то желательно учитывать возможное влияние ошибок дозирования пипеткой (5 %) и измерения оптической плотности спектрофотометром (10 %). Таким образом, сыворотки, оптическая плотность которых после постановки ИФА отличается не более чем на 15 % от диагностического уровня реакции, следует признавать сомнительными.

Помимо метода постановки ИФА с применением в качестве твердофазного носителя полистироловых планшетов или стрипов на территории Российской Федерации разрешены к применению тест-системы с использованием в качестве носителя пластиковых гребней, на зубцы которых нанесены специфический антиген и контрольные тест-образцы.

Реакция проводится с ингредиентами, заранее внесенными в ячейки реационной ванны. Результат оценивают по изменению окраски реакционных точек гребня (место нанесения антигена и контрольных антител, показывающих факт прохождения реакции).

Интерпретация результатов анализа.

По результатам постановки ИФА в одном диагностическом разведении (скрининг) без определения концентрации антител в испытуемой сыворотке (расчетных формул, калибровочных кривых или титров антител) можно судить только о факте встречи паразита

и хозяина. Определение концентрации специфических антител (в титрах, МЕ, АЕ) и ее изменение при раститровке позволяет судить о характере патологического процесса, а также об эффективности специфического лечения.

5.3.4. Правила работы с ингредиентами тест-систем ИФА

Хранение и использование тест-систем ИФА

Использовать реагенты и тест-системы не позднее указанного срока годности (при соблюдении условий хранения)

Не использовать реагенты из разных серий тест-систем ИФА, даже одного наименования.

Хранить реагенты и тест-системы, строго соблюдая условия, указанные производителем.

Перед использованием в ИФА температура всех реагентов должна быть доведена до комнатной – (18 ± 2) °С.

Неиспользованные стриповые планшеты тест-систем ИФА должны храниться в закрытых полиэтиленовых пакетах или фольге с вложенным поглотителем влаги (при его наличии).

Требования к посуде и наконечникам для пипеток

1. Использовать наконечники для пипеток в процессе постановки ИФА однократно.

2. По окончании постановки наконечники пипеток, используемые для разных ингредиентов, моют и обрабатывают отдельно.

3. Отбор концентрата ТМБ проводить только новыми наконечниками.

4. Наконечники, используемые для внесения субстратной смеси с разными хромогенами, хранить и использовать раздельно.

5. Для каждого из используемых в ИФА реагентов необходимо иметь отдельную посуду и наконечники.

6. Для мытья посуды и наконечников не использовать синтетические моющие средства.

Постановка реакции

1. При использовании замороженных образцов сывороток или других ингредиентов необходимо полностью разморозить их и затем перемешать пипетированием.

2. При разведении образцов сывороток и других ингредиентов необходимо тщательно перемешивать приготавливаемый раствор.

3. Все лунки планшета должны равномерно заполняться вносимыми реагентами.

4. При промывании планшетов необходимо заполнять лунки промывочным раствором полностью.

5. Избегать подсыхания лунок планшетов между внесением растворов.

6. Не касаться дна лунок планшетов во избежание их загрязнения.

7. Строго соблюдать временной и температурный режим постановки ИФА.

8. При учете результатов необходимо визуально контролировать показатели ОП, полученные на ридере:

9. Использовать только поверенные и аттестованные измерительные приборы (ридер, pH-метр и др.)

Правила работы с ингредиентами

1. Все используемые в ИФА хромогены являются свето- и влагочувствительными, поэтому должны храниться в плотно закрытой посуде в сухом и темном месте.

2. Не следует использовать сломанные таблетки хромогенов.

3. Не следует использовать флаконы с жидкими компонентами тест-системы, в которых наблюдается бактериальный рост или изменение цвета раствора.

4. Для приготовления растворов реагентов следует использовать дистиллированную воду.

Помимо описанного метода постановки ИФА в лунках планшетов или стрипов, существуют тест-системы с твердофазным носителем других форм (гребни, шараки, пробирки и т. д.).

5.4. Порядок направления рекламации поставщикам (производителям) диагностических тестов

При направлении поставщикам (производителям) диагностических медицинских иммунобиологических препаратов рекламаций на качество тест-систем необходимо учитывать следующее:

- рекламации предъявляются лишь к сериям иммунобиологических препаратов, у которых не истек срок годности;
- рекламация направляется в два адреса – предприятию изготовителю (адрес на упаковках диагностических наборов) и в Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского Московской медицинской Академии им. И. М. Сеченова (г. Москва, ул. М. Пироговская, д. 20);
- в рекламации следует подробно изложить претензии, предъявляемые к тест-системе (серии) диагностического препарата, а также приложить копии протоколов опытов, свидетельствующих о неудовлетворительном качестве препаратов;

• одновременно с рекламацией в адрес института отправляются (авиапочтой или с нарочным) тест-системы (невскрытые) из рекламационной серии.

5.5. Лабораторный контроль

Качество и достоверность лабораторных исследований зависят от организации внешнего и внутреннего лабораторного контроля, которые состоят из отдельных процедур (методик), направленных на получение надежных и сопоставимых результатов анализов.

5.5.1. Внутренний лабораторный контроль

Контроль качества внутренний (внутрилабораторный) – система мер, предназначенных для оценки качества результатов анализа, полученных в лаборатории. *Внутренний контроль качества лабораторных исследований* – это комплекс выполняемых лабораторией мероприятий и процедур, направленных на обеспечение и контроль стабильности требуемых условий для проведения анализов, а также предупреждения неблагоприятного воздействия факторов, возникающих в процессе подготовки, выполнения и оценки результатов анализа.

Внутрилабораторный контроль качества включает контроль *воспроизводимости и точности* (правильности) и может осуществляться с помощью методов, использующих специальные контрольные материалы или средства ряда методов, не требующих контрольных материалов.

Внутрилабораторный контроль качества предусматривает оценку деятельности всего медперсонала, участвующего в этапах работы, т. к. на любом из них возможны ошибки, связанные с подготовкой больного к исследованию, забором пробы, ее подготовкой к исследованию, хранением образцов и т. д. Возможны неточности при выписке и регистрации готовых анализов, а также в их трактовке.

Комплекс организационно-технических мероприятий, позволяющих контролировать технические и метрологические характеристики выпускаемых изделий, осуществляется на основе положения Государственной системы обеспечения единства измерений (ГСИ).

Для вновь разработанных приборов и установок проводят государственные испытания. Для изделий, изготовленных серийно, проводят испытания на заводе-изготовителе при выпуске.

Измерительные приборы подлежат поверке в соответствии с ГОСТ 8002—71. В соответствии с руководством по метрологическому обеспечению средств измерений определен порядок и сроки поверки измерительных приборов в лабораториях. Измерительные приборы поверяются ведомственными метрологическими органами

в соответствии с инструкцией, в которой указываются производимые операции и средства поверки. Поверке подлежат все технические и метрологические показатели, записанные в паспорте, прилагаемом к прибору. Работать на неповеренном приборе запрещается.

В каждой лаборатории необходимо проводить контроль качества используемого оборудования, который включает поверку и регистрацию состояния холодильников, водяных бань, термостатов, пипеток, таймеров, а также контроль качества дистиллированной воды (чистота, величина pH) в соответствии с МУ 2.1.4.1057—01 «Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды».

Паспорт производителя. К каждой серии наборов производитель прикладывает паспорт, в котором отражены, в т. ч., значения $ОП_{К+}$ и $ОП_{К-}$. В случае, если получены результаты, сильно отличающиеся от паспортных, следует проверить еще раз правильность постановки ИФА и, исключив возможность ошибки в проведении анализа и интерпретации полученных результатов, обратиться к производителю тест-систем.

Лабораторный контроль качества испытуемых тест-систем осуществляется в процессе их использования по показателям ОП всех контрольных точек (К+, К–, $К_л$, контроль конъюгата), определяемых паспортом производителя и инструкцией по применению.

Методы контроля качества, не требующие контрольных материалов

В лабораторной практике достаточно широко применяют методы контроля качества, в которых используют результаты исследования образцов пациентов.

Основные преимущества этих методов

1. Не требуют специального контрольного материала.
2. Обнаруживают ошибки, не выявленные другими методами.
3. Распространяют контроль на весь процесс исследования.

К ним относятся

1. Метод параллельных проб.
2. Исследование случайной пробы.
3. Исследование повторных проб.

Методы позволяют оценить воспроизводимость результатов исследований с помощью образцов сыворотки (плазмы) больных.

Контроль качества при проведении иммунологических (серологических) исследований

Основные направления в организации внутреннего контроля качества, и в первую очередь контроля соблюдения требований к условиям проведения анализа (лабораторные помещения, воздуш-

ная среда, температурные режимы инкубации и хранения, режимы дезинфекции и стерилизации), определены в нормативно-методической документации: МУ 2.1.4.1057—01 «Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды», СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

Перед проведением анализа контролируется следующее

1. При получении новой серии наборов тест-систем следует обязательно прочитать инструкцию. Практически все тест-системы совершенствуются, что может отразиться на методиках подготовки реактивов и протоколе реакции. Кроме того, тест-системы одного типа, но выпущенные разными предприятиями, могут иметь свои особенности постановки.

2. Хранить реагенты и тест-системы, строго соблюдая условия, указанные производителем. Использовать реагенты и тест-системы не позднее указанного срока годности (при соблюдении условий хранения). Неиспользованную часть планшета (стрипы) необходимо хранить в герметично закрытом (заклеенном) пластиковом пакете или в фольге, вкладывая внутрь пакетик с силикагелем для поглощения влаги.

3. Нельзя использовать наборы с истекшими сроками годности и смешивать реактивы из разных серий наборов.

4. Строго соблюдать временной и температурный режим постановки ИФА. При проведении реакции при низких температурах в лабораторных помещениях необходимо поддерживать комнатную температуру 18 ± 2 °С с помощью комнатных обогревателей или пользоваться при выполнении реакции ИФА настроенным на комнатную температуру термостатом.

5. Перед началом работы коробка набора должна быть вскрыта, а компоненты выдержаны при комнатной температуре в течение не менее 30 мин.

6. Если планшет разборный, и используются не все стрипы сразу, то после вскрытия оставшиеся стрипы следует поместить в пакет, который необходимо закрыть. Не следует удалять пакетик с влагопоглотителем.

7. При использовании замороженных образцов сывороток или других ингредиентов необходимо полностью разморозить их и затем перемешать пипетированием.

8. Флаконы с лиофилизированными реактивами следует вскрывать осторожно, не допуская потери материала. Так же осторожно нужно вносить во флакон растворитель, чтобы струей жидкости или током воздуха не удалить из флакона часть порошка. Растворять

лиофилизат (не допуская вспенивания!) следует не менее 20 мин, периодически покачивая закрытый флакон.

9. Растворение всех ингредиентов следует тщательно контролировать визуально, особенно это касается таблеток ортофенилендиамина.

10. Если производитель использует осушитель, меняющий цвет при насыщении влагой (наиболее распространена смена цвета с синего на розовый), запрещается использовать планшет в случае достижения осушителем «неправильного» цвета.

11. Серную кислоту для остановки ферментативной реакции следует вносить в лунки энергичным нажатием поршня пипетки («вспрыскиванием»), чтобы кислота хорошо перемешалась с субстратной смесью.

12. Использовать только специально предназначенные и подписанные емкости для приготовления реагентов.

13. Перед использованием убедитесь, что растворы и реагенты гомогенны.

14. Планшеты (стрипы) можно использовать для постановки ИФА только один раз.

15. Нельзя касаться внутренней поверхности лунки наконечником при внесении образца или реактива. Добавляя пробу в лунку с жидкостью для разведения образцов, обязательно 4—5 раз перемешивать содержимое лунки, насасывая его в наконечник и выпуская в лунку («пипетирование»). Вносить пробы или реактивы следует, не допуская вспенивания и загрязнения соседних лунок.

16. Перед инкубацией планшет необходимо закрывать крышкой. Это предотвращает излишнее испарение воды из лунок, оседание реактивов на их стенках и последующие ложноположительные результаты.

17. При промывании планшетов лунки следует заполнять отмывающим буфером почти до краев, но не допуская их переполнения через край. Целесообразно оставлять буфер в лунках на 20—30 с перед его удалением (отсасыванием). После промывания планшет следует перевернуть и легким постукиванием (о чистую фильтровальную бумагу, стерильную многослойную марлю, ветошь) удалить остатки жидкости из лунок.

18. Не следует допускать подсыхания лунок в период между инкубациями или промывками – возможно образование плохорастворимой пленки на их поверхности. Если очередной компонент не вносится сразу, планшет необходимо перевернуть вверх дном на фильтровальную бумагу до момента внесения реактива. В случае необходимости длительного перерыва следует положить планшет

вверх донышками лунок на смоченную водой марлю или фильтровальную бумагу, в норме – не допускать длительного перерыва.

19. Все лунки планшета должны равномерно заполняться вносимыми реагентами.

20. Жидкость для разведения проб содержит реактив, изменяющий цвет при внесении образца в лунку; в таких наборах ошибочно не внести пробу невозможно.

21. При учете результатов необходимо визуально контролировать показатели ОП, полученные на ридере.

22. При использовании стрипов следует работать с обязательной фиксацией стрипов в рамке. При наличии на донышках стрипов или планшетов (наружная поверхность, которая соприкасается с поверхностью стола) капель влаги, пылинок и других загрязнений – следует осторожно протереть донышки лунок с помощью мягкой, не оставляющей волокон салфетки до регистрации оптической плотности.

23. Не следует касаться дна лунок с внешней стороны – отпечатки пальцев или перчаток могут привести к неправильной регистрации оптической плотности.

Требования к посуде и приборам

1. Для приготовления ингредиентов следует использовать химически чистую посуду из нейтрального стекла. Нельзя использовать металлическую посуду!

2. Посуда для субстратной смеси и наконечники пипеток, которыми она вносится в планшет, должны быть идеально чистыми. Наличие даже следов хлорамина приводит к неспецифическому окислению ортофенилендиамина (ОФД) и браковке результатов анализа. Необходимо выделить отдельную посуду для приготовления и манипуляций с растворами конъюгата, ТМБ и ОФД. Посуду для растворов ТМБ, ОФД и конъюгата необходимо мыть более тщательно, так как влияние возможных загрязнений на эти растворы сильнее отражается на результате анализа.

3. Периодически следует проверять точность работы автоматических одно- и многоканальных пипеток, а также смазывать их поршни специальной смазкой по инструкции, которая прилагается к каждой пипетке.

4. По возможности следует избегать повторного применения пластиковых наконечников к микродозаторам. В случае необходимости наконечники должны промываться проточной водой, при этом необходимо следить за тем, чтобы промывалась внутренняя часть наконечников, после чего они должны быть промыты и прокипячены в дистиллированной воде. Для мытья посуды и наконеч-

ников нельзя использовать синтетические моющие средства (см. п. 5.3.4.1).

5. Наконечники, соприкасавшиеся с контрольной положительной сывороткой, использовать нельзя, в т. ч. после мытья и дезинфекции.

6. Для каждого из используемых в ИФА реагентов необходимо иметь отдельную посуду и наконечники. Наконечники, используемые для внесения субстратной смеси с разными хромогенами, хранить и использовать раздельно.

7. При работе одно- и многоканальными пипетками следует визуально контролировать забор ингредиентов в наконечники. Неправильное дозирование растворов на любой стадии анализа может привести как к росту, так и к снижению оптической плотности, замеряемой при оценке результата анализа.

Наиболее простой способ проверки пипетки – взвешивание дистиллированной воды, дозируемой пипеткой. Вес 1 мкл дистиллированной воды при комнатной температуре с большой точностью равен 1 мг. Таким образом, настроив пипетку на дозу 100 мкл, мы должны получить вес воды около 100 мг.

8. Использовать только метрологически поверенные и аттестованные измерительные приборы (спектрофотометры, pH-метр и др.)

Спектрофотометры являются самыми сложными из необходимых для постановки иммуноферментного анализа приборов.

Спектрофотометры различных фирм могут сильно отличаться конструктивно. Подключать спектрофотометр следует совместно со специалистами; в работе с прибором необходимо следовать инструкции по настройке программ с учетом его эксплуатационных особенностей (например, длительности времени прогрева спектрофотометра). Нарушение требований инструкции по эксплуатации прибора может привести к неправильному измерению оптической плотности.

9. Как ручные, так и автоматические промыватели в конце рабочего дня следует тщательно промывать дистиллированной водой для предотвращения проростов в шлангах. Недостаточная промывка, например при засорении каналов промывателей, приводит обычно к завышению сигнала. Может быть засорение пространства между иглами промывателя кусочками марли или ваты. Такое засорение приводит к заносу растворов из одной лунки в другие.

10. В случае необходимости следует прочистить мандреном отверстия промывочного аппарата (вошера). Особо тщательно планшет (стрипы) должен быть промыт после инкубации с конъюгатом,

т. к. именно следы неотмытого конъюгата – частая причина ложноположительных реакций.

11. В случае получения оптической плотности от контрольных образцов, не попадающих в интервал, описанный в соответствующем разделе инструкции, следует считать, что имеются ошибки при подготовке или постановке реакции, либо тест-система непригодна к применению.

12. Если используется ридер без калибровочного фильтра на 620—630 нм, следует учитывать возможность того, что мутные или загрязненные области планшета могут быть зарегистрированы с завышенным значением реальной оптической плотности.

13. Необходимо сличать полученную распечатку оптической плотности лунок с визуальной оценкой. Возможны искажения реальной оптической плотности в результате попаданий соринок в лунку или загрязнений донышка лунки.

Требования к наконечникам микродозаторов

1. Наконечники для автоматических пипеток желательно использовать однократно.

2. Лаборатории, у которых нет возможности однократного использования наконечников, должны соблюдать правильность обработки наконечников, при которой важно чтобы были учтены следующие моменты:

- замачивание в 6 %-ном растворе перекиси водорода;
- промывка после перекиси;
- кипячение;
- высушивание.

Методика дезинфекции наконечников и подготовки к повторному использованию

- Замачивание на 24 ч в 6 %-ном растворе перекиси водорода, содержащем 0,5 % жидкого моющего средства (типа жидкости для мытья посуды серии «Клер» по ТУ 2383—001—26332142—99) или хозяйственного мыла (50 г на 10 л воды).

Категорически запрещается использовать синтетические моющие средства (СМС) в виде любых стиральных порошков!

- Промывка холодной водой – 10 раз.
- Промывка дистиллированной водой – 2 раза.
- Кипячение в третьей порции дистиллированной воды не менее 40 мин.
- Сушка в сухожаровом шкафу при 80 °С не менее 5—6 ч до полного высыхания.

• Раскладка наконечников в штативы только пинцетом!

5.6. Документальное представление результатов выполнения методик

Документальное оформление результатов проведенных анализов производится в учетных формах журнальных (прилож. 2) и отдельных контрольных листах (прилож. 3), которые брошюруются за определенный период времени (месяц, квартал, год) или введется в виде отдельного журнала в зависимости от кратности и вида контроля.

В лаборатории должна быть в наличии нормативно-методическая документация, всесторонне регламентирующая деятельность лаборатории, в т. ч. на все проводимые методики. А также документация на техническое оснащение, поверку приборов, планировку, квалификацию специалистов и др.

Приложение 1

Примерный перечень оборудования для серологических исследований на паразитарные заболевания**

№ п/п	Наименование оборудования	Примерные марки, типы, объемы
1	Автоматические и (или) полуавтоматические микродозаторы с постоянными и переменными величинами объема	от 0,005 до 1 000 мкм
2	Наконечники полистироловые	от 0,1 до 1 мл
3	Микропробирки полистироловые типа «эппиндорф»	от 0,25 до 1,5 мл
4	Штативы для микропробирок	на 10—30- -50 гнезд
5	Штативы-держатели для микродозаторов	настольные, настенные и т. д.
6	Стеклянные химические стаканы	от 10 до 1 000 мл
7	Макропланшеты полистироловые для разведения сывороток	
8	Ванночки полистироловые для реактивов	
9	Емкости для дезрастворов (перекиси водорода) и дезинфекции наконечников	на 0,5—1 л и более
10	Прибор для измерения оптической плотности растворов (типа Мультискан, Биоскрин, Униплан, Факс-303 и др.)	с фильтрами длин волн 450—492 нм
11	Диагностические наборы и тест-системы для серологической диагностики паразитарных заболеваний, зарегистрированные и разрешенные к применению Минздравом России	выпускаемые отечественными и зарубежными иммунобиологическими предприятиями

*Серологическая диагностика паразитарных заболеваний проводится на базе типовой иммунологической (серологической) лаборатории.

В паразитологической лаборатории (подразделении), оснащенной стандартным оборудованием для серологических исследований, – при условии выполнения серологических исследований в отдельных лабораторных комнатах.

Правая сторона разворота журнала

Метод исследования	**Результат исследования** *при положительных результатах указать в соответствующей графе: класс иммуноглобулинов; оптическую плотность; титры антител (при скрининге – в крестах, при раститоровке – в титрах или международных единицах)*								Дата выдачи результата	Подпись проводившего исследование
	гельминтов					простейших				
						токсоплазма				
	Описторхис	Трихинелла	Токсокара	Эхинококк	Прочие (указать)	IgG	IgM	Прочие (расшифровать)		
17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27

ЖУРНАЛ
учета серологических исследований на паразитарные заболевания

Левая сторона разворота журнала

№ п/п	Ф.,И.,О. (возраст, адрес)	Учреждение, отдел ЦГСЭН, направившие на обследование	Цель исследования			Дата		Ход исследования							
								Проведены серологические исследования с антигенами (или антителами)							
								гельминтов					простейших		
			консультативно-диагностические	профилактические	по эпидпоказаниям; в очаге инвазии	приема материала на исследование	проведения анализа	Описторхис	Трихинелла	Токсокара	Эхинококк	Прочие (указать)	токсоплазма		Прочие (расшифровать)
													IgG	IgM	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

Приложение 3

Журнал (или отдельные листы учета)
КОНТРОЛЬНЫЙ ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЯ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

_____

№ планшета _____ Дата исследования _____

Серия тест-системы _____
№ стрипов с антигенами: _____
_____
_____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Результат анализа _____
_____
_____
_____

/Место наклеивания/

Результаты измерения оптической плотности
(на спектрофотометрах типа «Униплан», «Ридер», «Мультискан», «Стат-Факс», «Биоскрин» и т. п.)

gost.e-ecolog.ru