

**Национальная Академия наук Украины
Научно-технический центр иммунобиотехнологии
Института монокристаллов
Научно-производственная компания
«Диапроф-Мед»**

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА

Применение иммуноферментного анализа

(Практическое пособие)

Киев-2003

УДК 616.972 - 074

"Лабораторная диагностика сифилиса. Применение иммуноферментного анализа" утверждено и рекомендовано к печати Ученым советом АОЗТ НПК "Диапроф Мед"

Для врачей-лаборантов медицинских учреждений по работе с иммуноферментными тест-системами //Ростолира Н.М., Раевская Г.Е., Иванская Н.В.

Киев, "Диапроф Мед", 2003

Содержание

Список сокращений, используемых в тексте	3
Введение	4
Возбудитель сифилиса и его биологические свойства	4
Клинические особенности сифилиса	5
Иммунный ответ при сифилисе	6
Лабораторная диагностика сифилиса	9
Серологические методы диагностики сифилиса	10
Иммуноферментный анализ (ИФА) в диагностике сифилиса	13
Требования и рекомендации при проведении исследований методом ИФА	28
Проблемы, которые могут возникнуть при проведении ИФА	38
Список литературы	41
Приложение	42

Сокращения, использованные в тексте:

- АГ – антиген;
 АТ – антитело;
 ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;
 ГЗ – граничное значение;
 ИФА – иммуноферментный анализ;
 К⁻ – отрицательная контрольная проба;
 К⁺ – положительная контрольная проба;
 КСР – комплекс серологических реакций;
 МР – микропреципитации реакция ;
 ОП – оптическая плотность;
 ОЕ – оптическая единица;
 ОФД – ортофенилендиамин;
 ПЦР – полимеразная цепная реакция;
 РИ(Б)Т – реакция иммобилизации (бледных) трепонем;
 РИФ – реакция непрямой иммунофлюоресценции;
 РПИФ – реакция прямой иммунофлюоресценции;
 РСК – реакция связывания комплекса;
 ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;
 ВБИ – компания « Boston Biomedica Inc.», США;
 CDC (USA Centers for Disease Control and Prevention) – Центры США по проблемам контроля и предупреждения заболеваний;
 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазный иммуноферментный анализ;
 IgG, IgM, IgA – иммуноглобулины класса G, M, A;
 RPR (rapid plasma reagin) test – тест на определение быстрых плазменных реагинов;
 VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) – Лаборатория исследования венерических заболеваний.

Сифилис – широко распространенная инфекционная болезнь, вызываемая *Treponema pallidum*, которая характеризуется поражением кожи, слизистых оболочек, внутренних органов, костей и нервной системы, имеет волнообразное течение со сменой периодов обострения, скрытыми формами заболевания. По данным ВОЗ, ежегодно в мире возбудителем сифилиса инфицируется более 12 млн. человек [1]. Инфицирование происходит преимущественно половым путем, но возможна передача трансплацентарно (врожденный сифилис), при бытовых контактах (бытовой сифилис) и при переливании крови (гемотрансфузионный путь инфицирования).

В последние годы сифилис характеризуется не только высоким уровнем заболеваемости, но и преобладанием скрытых форм инфекции, нетипичным протеканием инфекционного процесса, устойчивостью возбудителя к применяемым в клинической практике лечебным препаратам. В связи с этим актуальным является своевременное выявление больных сифилисом среди населения и предотвращение распространения инфекции, в частности, путем трансфузии, поэтому во многих странах мира обследование крови доноров на маркеры сифилиса является обязательным.

Возбудитель сифилиса и его биологические свойства

Возбудитель сифилиса, *Treponema pallidum*, открытый в 1905 году Шаудином и Гоффманом, относится к семейству Spirochaetaceae. *T. pallidum*, или бледная трепонема, облигатный внутриклеточный паразит, обладает очень высоким средством к тканям лимфатических узлов, которые играют первостепенную роль в сохранении и развитии инфекционного процесса, во многом определяя особенности клинической симптоматики заболевания.

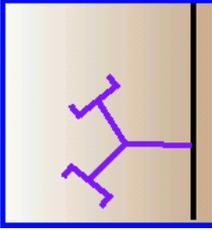
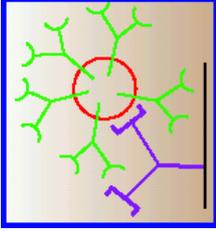
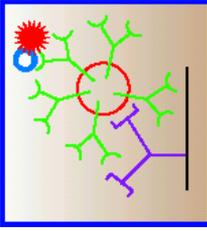
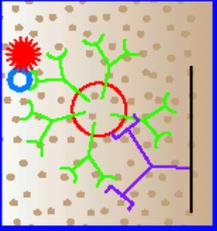
Для *T. pallidum* известен ряд структурно различных форм существования бактерий:

- Обычные спиралевидные (штопорообразные) грамотрепидательные бактерии, слабо преломляющие свет, с характерным вращательным движением вокруг собственной оси; обычно характерные для ранних стадий инфекции. Такие бактерии имеют внутреннюю и наружную

1. Singh A., Romanowski B. Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. // *Clinical Microbiology Reviews.* – 1999. – V. 12, № 2. – P. 187 – 209.
2. Скрипкин Ю.К., Мордовцев В.Н. Кожные и венерические болезни // Руководство для врачей. – 1999. – Т. 1. – 880 с.
3. Самцов А.В., Королькова Т.Н., Сухарев А.В. Иммунология сифилиса. Современные взгляды на развитие инфекционного процесса // *Дерматология и венерология.* – 1997. – № 1 (3). – С. 15 – 18.
4. Young H. Syphilis : serology. // *Dermatologic Clinics.*–1998. – V. 16, № 4. – P. 691 – 698.
5. Blanco D.R., Miller J. N., Lovett M.A. Surface antigens of the syphilis spirochete and their potential as virulence determinants // *Emerging Infectious Diseases.* – 1997. – V. 3, № 1. – P. 11 – 20.
6. Каур С., Сильм Х., Виндеровских Г., Шевчук О. Усовершенствование методов диагностики сифилиса при помощи определения антител к специфическим белкам возбудителя. // *Заболевания, передающиеся половым путем.* – 1998. – № 4. – С. 21 – 22.
7. Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е. Современные методы лабораторной диагностики сифилиса. Часть II. // *Вестник дерматовенерологии.* – 1996. – № 3. – С. 33 – 38.
8. Larsen S., Steiner B., Rudolf A. Laboratory diagnosis and interpretation of test for syphilis. // *Clinical Microbiology Reviews* – 1995. – V. 8, № 1. – P. 1 – 21.
9. Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е. Современные методы лабораторной диагностики сифилиса. Часть I. // *Вестник дерматовенерологии.* – 1996. – № 2. – С. 29 – 32.
10. Rostopira N., Tkačikova L., Rayevska G. et al. Elaboration of enzyme immunoassay based on recombinant antigens and intended for diagnostics of syphilis. // *Folia Microbiologica.* – 2003. – V. 48. – № 4. – P. 549 – 553.
11. Іванська Н. В., Мартиненко І. Л., Іванська Т.Ю. та ін. Оцінка методів серологічної діагностики сифілісу. // *Лабораторна діагностика.* – 1999. – № 3. – С. 38-42.
12. Милич М.В. Эволюция сифилиса. // М: Медицина. – 1987. – 149 с.

Схема
 проведения ИФА на тест-системе «DIA-IgM-SYPH»

«DIA-IgM-SYPH» - иммуноферментная тест-система для определения антител класса IgM к возбудителю сифилиса *Treponema pallidum*

Процедура	Формирование комплекса
Полистироловые стрипы, сенсibilизированы моноклональными антителами против IgM человека.	
Внесение в лунки стрипов по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл образцов контролей и исследуемых проб. Инкубация 30 мин при 37 °С (формирование комплекса антиIgM-IgM). Промывание лунок буферным раствором 4 раза.	
Внесение в лунки по 100 мкл раствора конъюгата. Инкубация 30 мин при 37°С (формирование комплекса с конъюгатом). Промывание лунок буферным раствором 6 раз.	
Внесение в лунки по 100 мкл раствора проявителя (перекись водорода и хромоген). Инкубация 30 мин при комнатной температуре (появление окрашивания в положительных пробах). Остановка реакции добавлением стоп-реагента. Регистрация оптической плотности	

цитоплазматическую мембрану, тонкий слой пептидогликана и жгутики, располагающиеся в периплазматическом пространстве клетки.

- Фильтрующиеся формы бактерий.
- Цист-формы и L-формы трепонем, возникающие обычно под действием лекарственных препаратов. Наличие дополнительных оболочек обеспечивает им дополнительную защиту от неблагоприятных воздействий, поэтому они могут сохраняться в организме на протяжении всей жизни.

Биологические свойства возбудителя приводят к многофазовому течению болезни, а при отсутствии лечения – к многолетнему хроническому инфекционному процессу [2].

Клинические особенности сифилиса

Сифилис – системная инфекция, для которой характерно чередование периодов активных проявлений заболевания скрытыми периодами. Согласно международной классификации болезней МКБ X, различают следующие клинические стадии сифилиса:

Врожденный сифилис

Ранний врожденный сифилис с симптомами

Ранний врожденный сифилис скрытый

Ранний врожденный сифилис неутонченный

Позднее врожденное сифилитическое поражение глаз

Поздний врожденный нейросифилис [ювенильный нейросифилис]

Другие формы врожденного сифилиса

Поздний врожденный сифилис скрытый

Поздний врожденный сифилис неутонченный

Врожденный сифилис неутонченный

Ранний сифилис

Первичный сифилис половых органов

Первичный сифилис анальной области

Вторичный сифилис кожи и слизистых оболочек

Другие формы вторичного сифилиса

Ранний сифилис скрытый

Ранний сифилис неутонченный

Поздний сифилис

Сифилис сердечно-сосудистой системы
 Нейросифилис с симптомами
 Асимптомный нейросифилис
 Нейросифилис неуточненный
 Другие симптомы позднего сифилиса
 Поздний сифилис скрытый
 Поздний сифилис неуточненный
 Другие неуточненные формы сифилиса
 Скрытый сифилис, неуточненный как ранний или

поздний

Инкубационный период при сифилисе составляет 3-4 недели. Болезнь начинается с образования шанкра - округлой язвы, секретирующей прозрачную жидкость, содержащую трепонемы. Через 20-30 дней шанкр исчезает, иногда оставляя рубец. Это стадия первичного сифилиса. При вторичном сифилисе трепонема распространяется через кровеносную и лимфатическую системы, манифестируя поражениями кожи и слизистых оболочек, полиаденопатией. Затем наступает скрытая стадия. Исчезают клинические симптомы вторичного сифилиса. Следующая стадия - поздний сифилис, который сопровождается поражениями внутренних органов: сердечно-сосудистой, нервной, костной систем, кожи и слизистых, что может привести к летальному исходу заболевания.

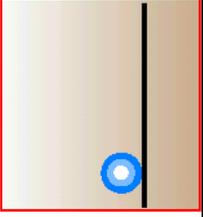
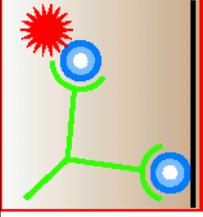
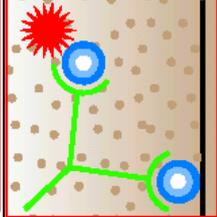
Врожденный сифилис возникает вследствие инфицирования плода во время беременности. У инфицированных беременных женщин трепонема проникают через хориальные ворсинки плаценты на 5 месяце беременности. Если заражение произошло в конце беременности, то инфекционный процесс развивается у новорожденных, как у взрослых (кроме поражения сердечно-сосудистой системы). Существует возможность скрытого и длительного бессимптомного течения инфекции, диагностируемой лишь по положительным серологическим реакциям крови ребенка [2].

Иммунный ответ при сифилисе

Иммунитет при сифилисе инфекционный и возникает как ответная реакция организма на присутствие в нем возбудителя и существует до тех пор, пока имеется в организме бледная трепонема.

Схема проведения ИФА на тест-системе «DIA-SYPH»

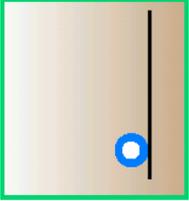
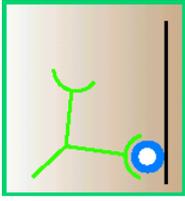
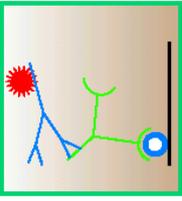
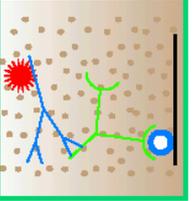
«DIA-SYPH» - иммуноферментная тест-система третьего поколения для определения антител к возбудителю сифилиса *Treponema pallidum*

Процедура	Формирование комплекса
Полистироловые стриппы, сенсibilизированы рекомбинантными белками.	
Внесение в лунки по 60 мкл раствора конъюгата и по 30 мкл образцов контролей и сывороток. Инкубация 90 мин при 37 °С (формирование комплекса АГ-АТ с конъюгатом)	
Промывывание 8 раз буферным раствором Внесение в лунки по 100 мкл раствора проявителя (перекись водорода и хромоген). Инкубация 30 мин при комнатной температуре (появление окрашивания в лунках с положительными образцами). Остановка реакции добавлением стоп-реагента. Регистрация оптической плотности	

ПРИЛОЖЕНИЕ

Схема**проведения ИФА на тест-системе «DIA-Treer»**

«DIA-Treer» - иммуноферментная тест-система для определения антител класса IgG к возбудителю сифилиса *Treponema pallidum*

Процедура	Формирование комплекса
Полистироловые стрипы, сенсibilизированные рекомбинантными белками.	
Внесение в лунки стрипов по 80 мкл раствора для разведения образцов и по 20 мкл образцов контролей и сывороток Инкубация 60 мин при 37 °С (формирование комплекса АГ-АТ). Промывание лунок буферным раствором (4 раза).	
Внесение в лунки по 100 мкл раствора конъюгата. Инкубация 30 мин при 37 °С (формирование комплекса с конъюгатом). Промывание лунок буферным раствором (6 раз).	
Внесение в лунки по 100 мкл раствора проявителя (перекиси водорода и хромогена) Инкубация 30 мин при комнатной температуре (окрашивание). Остановка реакции добавлением стоп-реагента. Регистрация оптической плотности	

Естественными барьерами, препятствующими проникновению возбудителя в организм человека, являются неповрежденная кожа; слизь, выделяемая клетками половых путей; бактерицидные компоненты организма (спермин, лизоцим, протеолитические ферменты), нормальная бактериальная флора половых путей. В реализации иммунного ответа организма на внедрение бледной трепонемы участвуют макрофаги, Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Первичный контакт организма с бактериями приводит к развитию неспецифической фагоцитарной реакции, в которой принимают участие нейтрофилы (полиморфоядерные лейкоциты) и мононуклеарные клетки - моноциты и тканевые макрофаги, которые обеспечивают захват микроорганизмов, процессинг и презентацию антигенов иммунокомпетентным клеткам. В фагоцитарной реакции могут участвовать также непрофессиональные фагоциты (плазматические клетки, фибробласты, перитциты нервных волокон, эндотелиоциты капилляров), в которых происходит депонирование трепонем в фаголизосоме, то есть фагоцитоз протекает по незавершенному типу, что не обеспечивает полной элиминации возбудителя, оставляя его вирулентным (эндодитобиоз). В ответ на стимуляцию происходит повышение продукции интерлейкинов и интерферонов клетками моноцитарного ряда. В результате их воздействия наблюдается активация локально действующих на антигены возбудителя Т-лимфоцитов и происходит запуск дифференциации В-лимфоцитов в цитоплазматические клетки, продуцирующие антитела к *T. pallidum* [3].

Первыми после инфицирования *T. pallidum* вырабатываются специфические антитела класса IgM, которые регистрируются со второй недели заболевания и достигают максимального уровня в крови на 6-9 неделе. Детекция специфических антител класса IgM имеет наибольшее значение при диагностике врожденного сифилиса, т.к. крупные молекулы IgM не проходят через плаценту и обнаружение их в крови новорожденных свидетельствует о внутриутробном заражении сифилисом. На четвертой неделе после инфицирования организм начинает продуцировать специфические антитела класса IgG. Это совпадает с периодом первичного серопозитивного сифилиса [3, 4].

На рис. 1 показана динамика антителообразования при инфицировании *T. pallidum*.

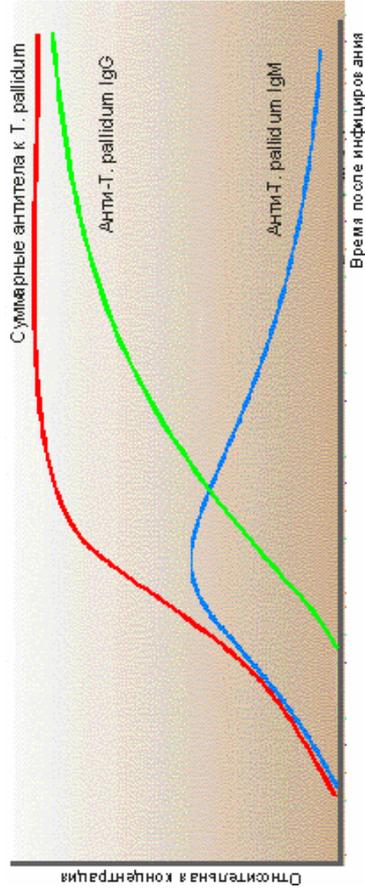


Рис.1

После адекватно проведенного лечения количество IgG-антител в крови постепенно снижается, но у некоторых переболевших сифилисом иммуноглобулины данного класса могут сохраняться достаточно длительное время и регистрироваться с помощью высокочувствительных реакций РИФ, РИТ, иммуноблоттинга и ИФА.

Существуют некоторые особенности гуморального иммунного ответа при сифилисе, обусловленные структурой возбудителя, а именно тем, что бледная трепонема содержит приблизительно в 100 раз меньше иммуногенных белков, связанных с наружной мембраной, чем типичные грамотрицательные микроорганизмы [5]. Наиболее перспективными в диагностических целях считаются липопроотеины, имеющие молекулярный вес 15, 17, 41-45, 47 кДа (p15, p17, TmpA, p47). Во-первых, перечисленные антигены видоспецифичны, то-есть характерны только для патогенной трепонемы. Во-вторых, на каждый из этих белков в сыворотках крови больных сифилисом регистрируются антитела, что свидетельствует об их высокой иммуногенности.

Связанный с внутренней мембраной протоплазматического цилиндра T.pallidum белок p17 вызывает наиболее активную продукцию антител, особенно на стадии вторичного сифилиса, за что он был назван «основным мембранным белком». Наряду с липопротеином p15 его можно успешно использовать, чтобы дифференцировать сифилис и болезнь Лайма (так называемый клещевой боррелиоз, или клещевой спирохетоз). Белок p47, так

4. После внесения проявителя и окончания срока инкубации нет окрашивания в лунках всего планшета	4.1. Не внесены один из реагентов – конъюгат или проявитель.	4.1.1. Переставить анализ. Внести, в соответствии с Инструкцией, необходимые реагенты.
Нет окрашивания в отдельных лунках планшета (рядов).	4.2. Не внесены один из реагентов – сыворотка, конъюгат или проявитель.	4.2.1. Переставить эти пробы. Внести, соответственно "Инструкции", необходимые реагенты.
5. Слабое окрашивание всего планшета. Значение ОП контрольных образцов не отвечают требованиям инструкции к тест-набору	5.1. Уменьшено время инкубации.	5.1.1. Инкубацию проводить согласно "Инструкции".
	5.2. Срок пригодности тест-системы закончился	5.2.1. Проверить результаты на тест-системе с надлежащим сроком годности.

	<p>2.3.Использование цельной крови.</p> <p>2.4.Бактериальное загрязнение проб.</p> <p>2.5.Использование одного и того же наконечника для нескольких проб.</p>	<p>2.3.1. Получить сыворотку. Повторно взять пробу крови.</p> <p>2.4.1. Повторно взять кровь.</p> <p>2.5.1. Использовать отдельные наконечники для каждой сыворотки.</p>
<p>3. Высокий фон в отдельных рядах</p>	<p>3.1.Повторное внесение проявителя.</p> <p>3.2.Повторное использование наконечников.</p> <p>3.3.Переливание жидкости из одного ряда во второй во время промывания.</p> <p>3.4.Загрязнение конуса автоматической пипетки раствором коньюгата.</p>	<p>3.1.1. Раствор проявителя вносить один раз.</p> <p>3.2.1. Наконечники использовать <u>однократно</u>.</p> <p>3.3.1. Отрегулировать подачу промывочного раствора.</p> <p>3.4.1. Для внесения коньюгата и проявителя иметь <u>отдельные</u> микропипетки. При отсутствии достаточного количества микропипеток нужно после внесения коньюгата и снятия наконечников, освободить пипетку от возможных остатков коньюгата и протереть ее фильтровальной бумагой.</p>

называемый пенициллинсвязывающий антиген, вызывает продукцию антител, как на первичной, так и на вторичной стадии сифилиса. Регистрация антител к r15 и r47, по данным авторов, позволяет диагностировать первичный и врожденный сифилис. Антитела против r47 не взаимодействуют с непатогенными трепонемами-комменсалами. Правда, используемый в серологической диагностике белок r41, ранее считавшийся специфичным именно для патогенных спирохет, обнаружили также у непатогенной *T. phagedenis Reiter*, однако его применение в тест-системах значительно повышает их чувствительность [6].

Лабораторная диагностика сифилиса

Методы диагностики сифилиса традиционно подразделяют на прямые, то-есть направленные на выявление возбудителя, и непрямые – серологические тесты для определения антител против бледной трепонема.

До недавнего времени основным лабораторно-диагностическим подходом при обнаружении первичного сифилиса был метод микроскопии в темном поле мазков, взятых из первичных поверхностных очагов развития трепонем (шанкров, пузырьков на слизистых, поверхности папул и т.д.). Такой метод применим для всех видов «бледных» микроорганизмов, в том числе сапрофитных трепонем, которые слабо преломляют свет. Результаты данного метода могут подтверждаться реакцией прямой иммунофлюоресценции (РПИФ), когда в поле зрения люминесцентного микроскопа проявляются спиралевидные бактерии со светящимися оболочками, обработанные мечеными флюорохромными красителями диагностическими антителами против трепонем. Однако не всегда, особенно при скрытых формах сифилиса, можно получить материал для описанных микроскопических исследований [7].

Современные методы выявления возбудителя основаны на определении в исследуемых образцах специфических фрагментов последовательностей нуклеиновых кислот *T.rallidum*. Наибольшее распространение среди них получил метод полимеразной цепной реакции – ПЦР (*polymerase chain reaction*), основанный на принципе естественной репликации ДНК, который включает расщепление двойной ее спирали, расхождение нитей ДНК и комплементарное

доставление обеих нитей (то есть синтез новых нитей ДНК). Чувствительность ПЦР такова, что возможна амплификация одной копии гена с увеличением его количества в миллион раз. Специфичность синтеза новых нитей ДНК достигается использованием олигонуклеотидов (коротких синтетических одностратчатых ДНК-молекул), которые фланкируют (ограничивают) последовательности ДНК, требуемые для размножения, и которые служат праймерами в механизме копирования с помощью ДНК-полимеразы.

Пока что ПЦР диагностика не используется широко в массовых скрининговых исследованиях, так как для проведения исследования данным методом необходимы специальные помещения, хорошо обученный персонал, дорогостоящее оборудование и высокое качество реактивов (особенно праймеров).

Из-за биологических особенностей *T. pallidum* попытки выращивать ее вне живых клеток были долго безуспешны, хотя появились уже первые сведения о размножении этого микроорганизма на питательной среде *in vitro*. Обычно возбудитель сифилиса хорошо развивается в организме кроликов, но болезнь протекает в течение 3-6 месяцев, а потому метод биологической пробы, хотя и высокочувствительный, мало пригоден для повседневной клинической практики.

Таким образом, из-за ограничений, присущих методам прямого обнаружения в клинических пробах *T. pallidum* или ее генетического материала, эти методы не всегда приемлемы и доступны в лабораторной практике, поэтому при диагностике сифилиса широкое применение получили непрямые (серологические) тесты.

Серологические методы диагностики сифилиса

Современные серологические методы диагностики сифилиса, подразделяются на трепонемные и нетрепонемные тесты. В случае нетрепонемных тестов используют явление так называемой антигенной мимикрии. Суть явления в том, что благодаря непрерывной эволюции живых организмов и процессу горизонтальной передачи генетической информации, клеточная стенка *T. pallidum* содержит ряд аминокислотных последовательностей (эпитопов), общих с эпитопами таких «небактериальных» соединений как

1. Высокий фон в лунках всего планшета.	1.5.Наличие и использование на рабочем месте дезрастворов с хлором.	1.5.1.Не использовать и не хранить дезрастворы с хлором в помещениях, где проводятся исследования методом ИФА.
	1.6.Повторное использование наконечников.	1.6.1.Наконечники использовать однократно.
	1.7.Контакт хромогена с металлами (пинцет, скальпель и др.)	1.7.1.Избегать контакта хромогена с металлами.
	1.8. Уменьшено количество циклов промывок планшета.	1.8.1.Промывать планшет согласно требованиям "Инструкции".
	1.9.Закончился срок хранения (пригодности) тест-системы.	1.9.1.Запретить использование тест-системы.
	1.10.Грязная посуда.	1.10.1.Мыть посуду согласно инструкции
	1.11.Увеличена температура или время инкубации	1.11.1.Придерживаться режима инкубации.
2. Высокий фон в отдельных лунках.	2.1.Переливание промывочного раствора из лунок планшета при промывании на промывателе (вошере).	Отрегулировать вошер, исключить возможные нарушения.
	2.2.Использование для анализа гемолизованных образцов.	2.2.1. Повторно взять кровь.

ПРОБЛЕМЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

Возникающие проблемы	Возможные причины	Способы устранения проблем
1. Высокий фон в лунках всего планшета.	1.1. Низкое качество дистиллированной воды	1.1.1. Промыть дистиллятор 10 %-ным раствором соляной кислоты, а потом 5 раз дистиллированной водой 1.1.2. Прокипятить дистиллированную воду в открытом сосуде в течение 10-15 мин, остудить перед использованием. 1.1.3. Использовать бидистиллированную воду
	1.2. Бактериальное загрязнение воды	1.2.1. Хранить дистиллированную воду в закрытой посуде. 1.2.2. Дистиллированную воду использовать в течение дня
	1.3. Загрязненный промыватель (вошер).	1.3.1. Почистить головку промывателя с помощью иголки и промыть его 30 %-ным этиловым спиртом, а потом 5 раз дистиллированной водой
	1.4. Использование одной и той же посуды для разных реагентов.	1.4.1. Использовать для каждого реагента отдельную посуду.

кардиолипин (выделяемый обычно из сердечной мышцы быка), лецитин и холестерин. К таким тестам относят реакцию связывания комплекса (РСК) – аналог реакции Вассермана. Анализ сыворотки проводят путем внесения антигена, компонента и индикаторной системы: эритроцитов барана и гемолитической сыворотки. При наличии в исследуемом образце антител к кардиолипиновому антигену происходит образование комплекса антиген-антитело, с которым связывается компонент; в противном случае комплекс не образуется, компонент связывается с гемолитической системой и наблюдается гемолиз эритроцитов.

Другим отборочным тестом, который вместе с РСК образует так называемый комплекс серологических реакций (КСР), служит реакция микропреципитации (МР). В случае инфицирования трепонемой преципитат образуется между антирепонемными антителами сыворотки больного и кардиолипиновым антигеном. За рубежом используют аналоги МР: VDRL-тест (по названию лаборатории разработчика – Veneral Disease Research Laboratory); тест определения активных реагенов – USR (unheated serum reagins); тест быстрых плазменных реагенов – RPR (rapid plasma reagins); тест с толуидиновым красным и непрогретой сывороткой – TRUST (toluidin red unheated serum test).

В тесте VDRL используется свежеприготовленный кардиолипиновый антиген и инактивированная сыворотка, которые смешиваются в стеклянной лунке механическим вращением. В тесте USR используется нативная плазма и антиген стабилизированный холин хлоридом и ЭДТА (такой антиген не нуждается в ежедневном приготовлении). Образцы в этих реакциях агрегаты выявляют микроскопированием. RPR и TRUST тесты предполагают использование активированного угля или азокрасителя, соответственно, для возможности визуального учета результатов теста.

Характеристики неспецифических тестов сходны – недостаточная чувствительность, особенно на начальной стадии заболевания, необходимость индивидуального считывания результатов каждого исследования микроскопически или визуально, что приводит к субъективности оценивания, а также большое количество ложноположительных результатов. Они часто определяются при системных и онкологических заболеваниях,

вирусных инфекциях (гепатиты, мононуклеоз), заболеваниях соединительной ткани, при беременности и вакцинациях, а также у лиц пожилого возраста. Кроме того, ложноположительные реакции регистрируются при болезнях, возбудители которых имеют антигенное сходство с бледной трепонемой (фрамбезия, беджель, пинта, лептоспирозы) [7].

Специфические (трепонемные) серологические тесты позволяют определять антитела именно к T.pallidum. Они применяются для подтверждения результатов нетрепонемных тестов, а также в тех случаях, когда скрининговые обследования дают отрицательные результаты, а клиническая картина предполагает наличие сифилитической инфекции.

Одной из первых серологических реакций для определения анти-T.pallidum антител была реакция иммубилизации бледных трепонем (РИ(Б)Т или РИТ), предложенная R.Nelson и M.Maueг в 1949 году. Метод основан на явлении снижения подвижности трепонем под влиянием сыворотки крови больных сифилисом. Реакция высокоспецифична, потому что в качестве антигена в ней используют взвесь бледных трепонем, полученных из тканей при сифилитическом орхите кроликов, однако именно трудности приготовления антигена обуславливают ограниченное применение теста в централизованных лабораториях. К недостаткам РИБТ следует также отнести недостаточную чувствительность на этапе первичного сифилиса, когда уровень антител (в частности, IgM) недостаточен для регистрации положительного результата.

Более распространенным трепонемным тестом является реакция непрямой иммунофлюоресценции (РИФ, Fluorescent Treponemal Antibody, FTA), которая во многих странах считается “золотым стандартом” при апробации новых методов диагностики. Для исследования патогенные бледные трепонемы (штам Nichols) фиксируют на предметном стекле, обрабатывают образцом разведенной исследуемой сыворотки или спинномозговой жидкости, а затем мечеными флюоресцеином антителами к иммуноглобулинам классов G и/или M человека. Флюоресцирующий комплекс образуется на поверхности трепонемы. В принятой на практике РИФ-abc для разведения сыворотки применяют экстракт непагогенных культуральных трепонем штамма Reiter, что приводит к элиминации неспецифических антител и увеличению специфичности реакции.

Чтобы проверить воспроизводимость спектрофотометрической оценки результата в каждой лунке планшета, необходимо несколько раз повторить определение ОП в одних и тех же лунках планшета.

Чтобы оценить равномерность результатов измерения по всей поверхности планшета, следует во все лунки пустого чистого планшета внести одинаковый объем окрашенного раствора. Такой раствор можно приготовить, добавив к раствору проявителя (приготовленного согласно инструкции к тест-системе) небольшое количество пероксидазного конъюгата. Количество конъюгата при этом подбирают эмпирически, так чтобы ОП полученного окрашенного раствора находилась в интервале от 0,3 до 1,0 оптической единицы (ОЕ). После внесения такого раствора во все лунки планшета и добавления стоп-реагента проводят спектрофотометрическое измерение ОП. Отклонение от среднего результата измерения в пределах одного планшета не должно превышать 5 %.

Для более корректной оценки результатов ИФА необходимо работать на ридере в двухволновом режиме (492 нм относительно 620 нм для проявителя с ОФД и 450 нм относительно 620 нм для ТМБ). При основной длине волны определяют ОП конечных продуктов ферментативной реакции в пробе, а при отсекающей – ОП планшета (полистирола). В двухволновом режиме ридер фиксирует разницу между ОП при основной и отсекающей длинах волн.

Действия при неожиданных нарушениях рабочего режима

В случае неисправности спектрофотометра или при отсутствии света возможный выход для сохранения результатов ИФА – быстрое замораживание планшета с образцами после добавления стоп-реагента в раствор проявителя с последующим быстрым размораживанием при комнатной температуре перед измерением ОП на следующий день. Следует учитывать, что ОП все же возрастет, а относительный прирост сигнала будет большим для меньших значений ОП.

Если термостат не обеспечивает необходимой температуры, следует прекратить работу. Самая распространенная ошибка – проведение ИФА при пониженной температуре с увеличением времени инкубации. Однако различные тест-системы реагируют на снижение температуры и изменение продолжительности инкубации по-разному, поэтому однозначной рекомендации относительно работы при неисправном термостате нет.

работу термостата, поместив ртутный термометр в середину камеры термостата, туда, где обычно размещают планшеты.

Автоматические промыватели планшетов (вошеры). Качественное промывание планшета на каждом этапе работы способствует корректному проведению анализа. Все лунки планшета должны равномерно заполняться промывочным раствором в необходимом объеме; затем раствор должен полностью удаляться. Кроме того, необходимо строго и четко придерживать всех требований, указанных в инструкции к тест-системе, в отношении количества промывок и времени между заполнением лунок и удалением раствора.

Самая частая ошибка – загрязнение остатками солей, кусочками марли или ваты каналов промывателя или пространства между иголками. Последнее случается реже. Из-за такого загрязнения раствор может попадать из одной лунки в другую.

В ходе промывания необходимо следить за равномерностью заполнения всех лунок планшета и удаления из них жидкости. Кроме того, следует периодически проверять объем заполнения лунок, используя пипетку, настроенную на нужный объем.

Чтобы избежать неудовлетворительной работы автоматических и ручных промывателей, необходимо ежедневно после окончания работы промывать их дистиллированной водой, не допуская образования осадка солей промывочного раствора и загрязнения каналов промывочной системы. Один раз в неделю следует обеззараживать промыватель 30 % -ным раствором этилового спирта, а потом 5 раз промывать дистиллированной водой.

Спектрофотометры многоканальные (ридеры, иммуноферментные анализаторы)

Спектрофотометры используются, для автоматической регистрации результатов иммуноферментного анализа, поэтому необходимо периодически (1 раз в год) проводить метрологический контроль. Метрологическая поверка обеспечивает правильность полученных результатов.

В ежедневной практике ИФА следует помнить о том, что для выхода на рабочий режим прибор должен прогреться (время прогревания для каждого конкретного прибора указано в инструкции к прибору). Существуют простые приемы для проверки точности работы спектрофотометра.

Наиболее просты в применении реакции, основанные на принципе гемагглютинации (реакция пассивной гемагглютинации РПГА; T.pallidum hemagglutination assay, ТРНА), которые не требуют специального оборудования и высокой профессиональной подготовки персонала. В тест-наборах РПГА используют эритроциты, на которых абсорбированы антигены патогенных трепонем. Разведение сывороткой больного сифилисом суспензии таких эритроцитов вызывает их склеивание, то есть гемагглютинацию. Сейчас разработан микрометод этой реакции (microhemagglutination assay – МНА-Тр) и ее автоматизированная модификация. Некоторые современные тесты на основе гемагглютинации используют в качестве носителя антигенов не эритроциты, а желатиновые или лаковые частицы [7, 8].

К наиболее современным серологическим методам диагностики сифилиса принадлежат иммуноферментный анализ и иммуноблоттинг (Western blot). Они позволяют определять антигена IgG и/или IgM, специфические к бледной трепонеме или отдельным антигенам. В классическом методе иммуноблоттинга лизат T.pallidum подвергают электрофорезу. Затем белки из полиакриламидного геля переносят на нитроцеллюлозу и в дальнейшем нитроцеллюлозные отпечатки антигенов инкубируют с образцами исследуемых сыворок и конъюгатом (антигенами к иммуноглобулинам человека, меченными ферментом), что приводит к окрашиванию антигенных полосок, которые соответствуют иммуногенам с определенным молекулярным весом. Модифицированным вариантом иммуноблоттинга является рекомбинантный иммуноблот, в котором антигены иммобилизованы на нейлоновых стрипах [8, 9].

Иммуноферментный анализ (ИФА) в диагностике сифилиса

Метод иммуноферментного анализа впервые был предложен для диагностики сифилиса J.Velkamp и A.Visser в 1975 году. Принцип ИФА состоит в том, что специфические антигена из исследуемой сыворотки связываются с антигеном на твердой фазе и затем выявляются конъюгатом, в состав которого входит фермент, инициирующий реакцию преобразования субстрата и развитие цветной реакции.

Существует несколько модификаций твердофазного ИФА с разнообразными схемами проведения реакции и конъюгатами. Для

диагностических целей наиболее часто используются непрямой вариант ИФА, конкурентный тип, «сандвич-вариант» и «захват». В непрямом варианте ИФА, принципиальная схема которого показана на рис. 2, в составе иммуносорбента используют антигены, полученные путем разрушения клеток патогенных штаммов трепонем, а также созданные методами генной инженерии или химического синтеза. Все они имеют определенные преимущества и недостатки. Суспензии разрушенных клеток возбудителя более полноценны из-за присутствия в них всех иммунореактивных антигенов, но при их использовании часто возникают неспецифические реакции, обусловленные наличием липидных структур. Работа с синтетическими пептидами или рекомбинантными белками позволяет избежать ошибочных реакций. Применение технологии рекомбинантных ДНК, включая клонирование, экспрессию генов и очистку рекомбинантных трепонемных антигенов, позволило разработать тест-системы нового поколения. Однако при создании тест-систем на основе таких антигенов возникает опасность, что иммуносорбенты, содержащие аналоги не всех, а лишь некоторых антигенных детерминант, могут не перекрывать всего спектра антигел, возникающих при инфицировании T. pallidum. Поэтому, ряд специальных исследований был направлен именно на выявление тех антигенов и иммунодоминантных эпитопов, введение которых в состав иммуносорбента позволяет значительно повысить чувствительность ИФА [10].

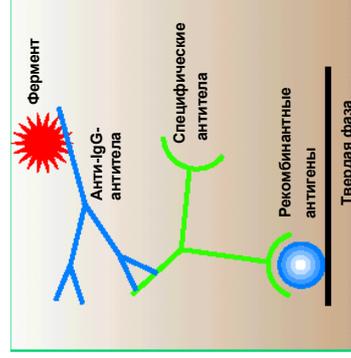


Рис. 2

должен изменять цвет в течение 30 мин.; окрашивание проявителя в ванночке свидетельствует о его загрязнении.

Периодический контроль работы оборудования

Важным фактором, влияющим на проведение ИФА, является точность работы оборудования. Поэтому следует обязательно проводить периодический контроль работы автоматических пипеток, термостатов, спектрофотометров (ридеров), промывателей.

Автоматические пипетки. Допустимая ошибка при измерении объемов автоматическими пипетками при проведении ИФА – 2 %. Исползуемые пипетки должны соответствовать диапазонам необходимых объемов. При проведении анализа каждая операция с использованием пипетки должна тщательно контролироваться, поскольку любая неточность или ошибка (особенно при перенесении малых объемов) может оказать влияние на достоверность полученных результатов.

Автоматические пипетки должны обязательно один раз в год проходить метрологическую поверку. Кроме того, необходимо ежемесячно проверять точность работы пипетки гравиметрическим способом. Для этого наконечник плотно насаживают на пипетку. Пипетки сменных объемов устанавливают на средний объем. Следует 5 раз набрать дистиллированную воду, каждый раз взвешивая выпущенную из дозатора каплю на весах с точностью измерения до 0,1 мг. Оценивая точность работы пипетки, исходят из того, что 1 мл дистиллированной воды при комнатной температуре имеет массу 1 г. Если все измерения укладываются в допустимый интервал ($\pm 2\%$ от установленного), то считают, что пипетка пригодна для использования. Если это не так, то пипетку необходимо смазать и настроить или заменить.

Термостаты. Для получения правильных результатов анализа важно также, чтобы термостат поддерживал необходимую температуру, указанную в инструкции к данной тест-системе. Допустимое отклонение ($\pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$); при снижении температуры понижается чувствительность проведенного анализа, а при повышении – его специфичность. Показания внешнего термометра, вмонтированного в термостат (при наличии такого термометра) иногда могут не соответствовать истинной температуре на полках прибора. Поэтому необходимо периодически контролировать

Инкубация проб с раствором проявителя, который содержит хромоген, должна проводиться при комнатной температуре. При этом необходимо знать, что стандартной комнатной температурой считают температуру 18-25 °С. Именно на такую температуру рассчитана продолжительность инкубации, указанная в инструкции. Если температура в комнате ниже 18 °С, ферментативная реакция замедляется, это может привести к снижению чувствительности проведенного анализа. В таком случае рекомендуется проводить инкубацию с проявителем в термостате, настроенном на температуру 20-25 °С.

Отмывка планшета на каждом этапе проведения ИФА

Режим отмывания на каждом этапе ИФА должен точно соответствовать требованиям инструкции к тест-системе; для разных тест-систем условия промывания могут быть неодинаковыми. Следует иметь в виду, что качество отмывания планшета – один из основных факторов при проведении ИФА, поэтому необходимо очень внимательно относиться к этой процедуре. Необходимо следить за равномерностью заполнения лунок и удаления жидкости из всех лунок планшета. Время между заполнением лунок раствором для промывания и удалением жидкости должно быть не меньше 30 с.

Правила работы с конъюгатами и проявителем

Для внесения конъюгата и проявителя следует иметь отдельные, промаркированные для этих процедур микропипетки и ванночки.

Следует исключить возможность контакта проявителя с синтетическими моющими средствами и с хлорамином. Поэтому для работы с проявителем необходимо использовать отдельную посуду и наконечники. Дезинфекцию инструментов и вспомогательных материалов следует проводить 6 %-ным раствором перекиси водорода или 70 %-ным этиловым спиртом.

Недопустим контакт таблеток ОФД и раствора ТМБ, а также раствора готового проявителя с металлами.

Раствор проявителя непосредственно перед употреблением должен быть прозрачным и бесцветным. Планшет с внесенным субстратом и хромогеном необходимо инкубировать в темноте. Остатки раствора в ванночке не рекомендуется выливать до окончания инкубации планшета с проявителем. Хромогенный субстрат, оставшийся в ванночке, не

Для достижения высоких диагностических характеристик иммуноферментной тест-системы наряду с оптимальным антигенным составом иммуносорбента необходимо использовать высокоспецифичный антивидовой конъюгат. Он может быть представлен моноклональными или поликлональными антителами к иммуноглобулинам классов G и/или M человека, конъюгированными с ферментом. Необходимо отметить, что в некоторых тест-системах такого типа в качестве связывающего сывороточные антитела компонента используется меченный ферментом рекомбинантный белок А (аналог белка A *Staphylococcus aureus*). Такой конъюгат позволяет выявлять антирепонемные иммуноглобулины только класса G (подклассы IgG1, IgG2, IgG4).

В «сэндвич-варианте» ИФА (см. рис. 3), связанные с антигенами на твердой фазой сывороточные антитела выявляются с помощью конъюгата, содержащего те же антигены, которые использованы для получения иммуносорбента. Это дает возможность выявлять в сыворотке крови больных антирепонемные иммуноглобулины всех классов (IgA, IgM, IgG) и за счет этого достигать большей чувствительности тестирования. Специфические антитела всех классов позволяет определять также принципиально иной вариант анализа – конкурентный ИФА, применяемый в лабораторной диагностике сифилиса. В этом варианте анализа в реакционной среде присутствуют меченные ферментом анти-T.rallidum поликлональные антитела, конкурирующие с сывороточными антителами за ограниченное количество мест специфического связывания. При этом величина оптической плотности исследуемого образца обратно пропорциональна количеству специфических антител.

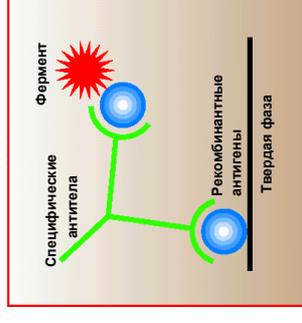


Рис. 3

ИФА типа «захват», как правило, используется для определения иммуноглобулинов класса М. В этом случае моно- или поликлональные антитела против IgM человека сорбируют на полистироловых планшетах. При инкубации исследуемого материала IgM-антитела связываются с антивидовыми антителами на твердой фазе, а специфические среди них в дальнейшем выявляют с помощью конъюгата пероксидазы хрена и рекомбинантных и/или синтетических белков – аналогов антигенов бледной трепонемы. Схема такой модификации ИФА представлена на рисунке 4. Данная схема проведения ИФА для определения специфических IgM имеет ряд преимуществ над прямым ИФА для выявления антител этого класса:

- при выявлении специфических IgM, присутствующие в сыворотке IgG не конкурируют за места связывания со специфическим антигеном, что наблюдается в случае использования непрямого ИФА;
- отсутствует неспецифическая реактивность, обусловленная присутствием ревматоидного фактора.

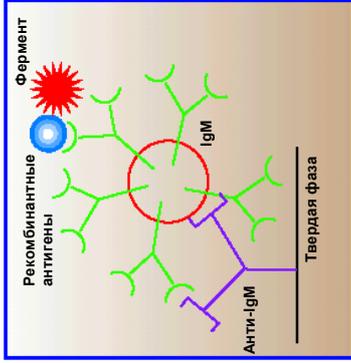


Рис. 4

Пользуясь различными вариантами ИФА можно определять антирепонемные иммуноглобулины отдельного класса (IgG или IgM), а также суммарные антитела (IgG+IgM+IgA) к *Treponema pallidum*. В зависимости от полученных результатов (положительных или отрицательных) с использованием данных тестов, можно сделать вывод о течении инфекции. В таблице 1 представлены возможные

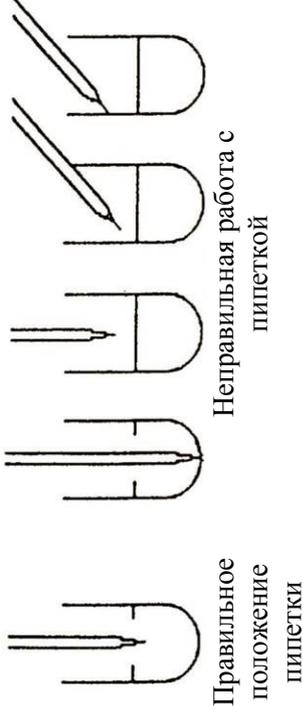


Рис. 6

- В положении, когда наконечник слегка опущен в жидкость, плавно отпустите операционную кнопку (до исходного положения). Таким образом, наконечник наполняет для пипетирования (размешивания). Повторите эту процедуру 2-3 раза.

- Напоследок нажмите на операционную кнопку до второго упора для полного удаления жидкости из наконечника. Вытяните наконечник из жидкости и отпустите операционную кнопку в исходное положение.

- Снимите наконечник с конуса пипетки, не касаясь его, с помощью механизма для снятия наконечников.

- Замените наконечник и продолжайте работу со следующим образцом.

3. При работе с сыворотками или другими биологическими жидкостями тонкая пленка жидкости остается на стенках наконечника, что может изменить пипетируемый объем. Этого можно избежать, если смочить наконечник в пипетируемой жидкости (т.е. правильно перемешать ее, как описано выше) и только после этого набирать нужный объем.

Температурный режим и время инкубации

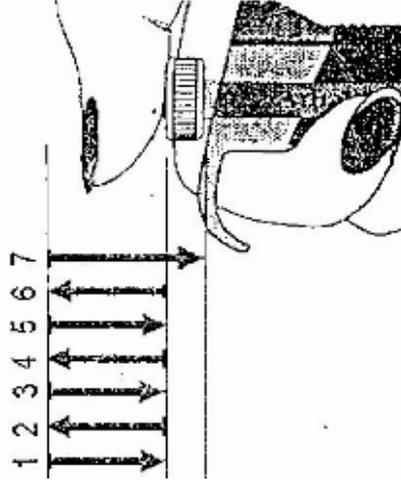
При проведении анализа температура в лаборатории должна быть 18-25 °С.

Как правило, инкубация исследуемых сывороток и конъюгата проводится в термостате. Для равномерного прогрева планшетов рекомендуется класть на металлическую полку термостата листок бумаги.

При работе с автоматической пипеткой необходимо придерживайтесь следующих правил:

1. Установите нужный объем как указано в инструкции к пипетке.
2. Убедитесь, что наконечник чистый и в нем нет посторонних пластиковых частичек; плотно наденьте его на конус пипетки.
4. В ходе работы держите пипетку вертикально (максимальное отклонение от вертикали 10°).
5. Для лучшей работы крепко держите пипетку в руке, большой палец должен находиться на операционной кнопке. Последовательность работы при внесении образцов приведена на рисунке 3.

Начальное положение



Первый упор

Второй упор

Рис. 5

- Опустите наконечник на 2-3 мм в жидкость, нажмите на операционную кнопку до первого упора (рис.5) и плавно опустите кнопку.
- Не вынимая наконечник из жидкости, осторожно опустите кнопку в исходное положение.
- Опустите наконечник на 2-3 мм в жидкость, куда необходимо перенести отобранную жидкость, нажмите на операционную кнопку до первого упора. Избегайте касания наконечником стенок и дна лунок (рис.6).

результаты при проведении ИФА для определения антител к бледной трепонеме и их интерпретация.

Таблица 1. Результаты ИФА-исследований при диагностике сифилиса и возможная интерпретация

Наличие специфических антител против T.pallidum		Стадия заболевания
IgG	IgM	
-	+	Ранняя стадия сифилиса (окончание инкубационного периода – начало первичного серонегативного сифилиса)
+	+	Окончание первичного серонегативного, первичный серопозитивный, вторичный свежий, вторичный рецидивный сифилис
+	-	Возможен вторичный скрытый либо пролеженный сифилис

Как видно из таблицы 1, на стадии первичного серонегативного сифилиса целесообразно использовать тесты для определения антител класса IgM или суммарных антител. Поэтому, с точки зрения ранней диагностики заболевания перспективно применение иммуноферментных тест-систем для выявления специфических IgM. Обнаружение в сыворотке антител этого класса позволяет определить активность инфекционного процесса. Показано, что содержание IgM в сыворотках инфицированных лиц при первичном и вторичном свежем сифилисе бывает значительно большим, чем при других формах

сифилиса, а серологически различать эти две формы сифилиса затруднительно. На стадии первичного серопозитивного, вторичного свежего и вторичного рецидивного сифилиса можно использовать тесты, позволяющие определять уровень суммарных антител. Присутствие в крови большого антирепонемных IgG антител, которые могут быть выявлены как с помощью их дифференцированной диагностики, так и в тестах на общий уровень антител, может свидетельствовать о вторичном скрытом или пролеченном сифилисе.

Значимость определения антирепонемных IgM антител:

1. Диагностика врожденного сифилиса (трансплацентарный барьер преодолевают только материнские IgG);
2. Регистрация первичного сифилиса (при инфицировании IgM-антитела появляются раньше чем IgG на 1,5 – 2 недели);
3. Дифференциация серорезистентных форм заболевания (титры антител в процессе лечения не уменьшаются) от ложной серорезистентности, вызванной иммунопатологией. Наличие IgM-антител при положительных реакциях КСР, РИФ и/или РИБТ свидетельствует об истинной серорезистентности;
4. Контроль излеченности. IgM-антитела при адекватном лечении исчезают ранее IgG, которые могут долго еще оставаться в организме в количествах, определяемых чувствительными реакциями (ИФА, иммуноблоттинг).

НПК «Диапроф-Мед» производит следующие тест-системы для диагностики сифилиса.

- **Тест-система «DIA-Trep»** (непрямой вариант ИФА)
В составе иммуносорбента использованы рекомбинантные антигены-аналоги трепонемных белков p15, p17, TmpA и p47; в конъюгате - меченные пероксидазой хрена моноклональные антитела человека. Тест-система предназначена для выявления в сыворотках больных сифилисом антител класса IgG против *Treponema pallidum*.

анализа заполнить протокол исследования, где на схеме планшета показана планируемая последовательность внесения проб. Такая схема поможет лаборанту сосредоточенно работать. Также рекомендуется использовать дополнительный штагив, чтобы переставлять туда пробирки с обработанным материалом.

Правила работы с автоматическими пипетками представлены ниже в следующем разделе.

Планшет перед внесением сывороток лучше поставить на белый стол или белый лист бумаги. На белом фоне легче следить за изменением цвета в лунках с внесенными сыворотками; снижается вероятность ошибки при внесении компонентов.

При внесении контрольных и исследуемых образцов необходимо осторожно пипетировать смесь в лунках.

Если при внесении анализируемого образца произошла ошибка, например, две сыворотки внесены в одну лунку, необходимо сразу отметить эту лунку как «брак» в протоколе внесения и результаты анализа в ней не учитывать.

Реакция связывания антител с антигеном начинается сразу после внесения сыворотки в лунку планшета, поэтому необходимо стараться уменьшить время между началом и окончанием внесения проб.

Последующие манипуляции с планшетом (внесение растворов конъюгата, проявителя и стоп-реагента) нужно проводить с помощью многоканальной пипетки, начиная вносить реагенты с того же ряда, с которого начали вносить сыворотки.

Закончив работу, следует занести в протокол результаты анализа (вклеить распечатку с принтера ридера). Таким образом, лаборатория получит документ, удобный для хранения информации о проведенном исследовании.

Правила работы с автоматической пипеткой

Автоматические пипетки – это дозаторы с регулируемым объемом; они широко используются для взятия и переноса точных объемов жидкости. Принцип действия пипетки – перемещение определенного объема воздуха между поршнем и жидкостью. Для взятия жидкости используют сменные наконечники, которые должны стоять в специальном штативе. У большинства пипеток есть механизм для сбрасывания наконечников.

Соблюдение инструкции по применению тест-системы

Как правило, в инструкции указаны основные моменты, существенные для получения правильных результатов при проведении ИФА с использованием данной тест-системы, поэтому инструкцию нужно прочитать внимательно. Практически все тест-системы со временем совершенствуются, это сказывается на изменениях в методиках подготовки реактивов и проведения реакции.

Для разбавления реагентов и промывки приборов необходимо использовать качественную и свежую дистиллированную воду, которая хранится не более 24 час.

С точки зрения санитарной безопасности, а также из соображений, связанных с качеством работы, запрещено повторно использовать планшеты тест-систем для любых целей. Они после работы обязательно обеззараживаются и утилизируются.

Нельзя использовать компоненты из наборов различных серий, поскольку все компоненты тест-системы и условия проведения анализа (в частности, рабочее разведение конъюгата) определяются производителем для каждой серии наборов.

Соблюдение инструкции по надлежащей практике работы в помещениях.

где хранятся тест-системы и проводятся исследования методом ИФА

Недопустимо присутствие на рабочем месте в лаборатории паров окислителей (открытых емкостей с растворами перекиси водорода, гипохлорита и тому подобное). Нельзя хранить и использовать растворы с хлором в помещениях, где в данный момент проводится исследование методом ИФА.

Соблюдение сроков и условий хранения наборов

Качественная работа диагностических наборов гарантирована производителем лишь в пределах указанного срока годности и при соблюдении соответствующих условий хранения.

Общие рекомендации по качественному проведению анализа

Поскольку при постановке ИФА одновременно исследуют большое количество проб, может произойти путаница при их внесении в лунки планшета. Чтобы этого избежать, рекомендуется перед началом

- **Тест-система «DIA-SYPH»** («сэндвич»-вариант ИФА)

В составе иммуносorbента и в составе конъюгата использованы рекомбинантные антигены р17 и р47. Тест-система позволяет выявлять в исследуемых образцах сывороток суммарные антитела к бледной трепонеме, то есть антитела классов IgM, IgG, IgA.

- **Тест-система «DIA-IgM-SYPH»** (ИФА типа «захват»)

В составе иммуносorbента использованы моноклональные антитела к IgM человека, а в конъюгате – рекомбинантные белки-антигены T.pallidum с молекулярным весом 17 и 47 кДа, меченные пероксидазой хрена.

Схемы проведения иммуноферментного анализа для вышеперечисленных тест-систем представлены в Приложении.

При проведении лабораторных исследований необходимо решить вопрос о выборе тест-системы. По современным представлениям, для оценки качества и пригодности тест-системы используют научные, медицинские и экономические критерии. Научные критерии выбора метода включают в себя определение чувствительности, специфичности и воспроизводимости диагностикумов.

Чувствительность – показатель, характеризующий способность тест-системы выявлять максимальное количество истинно положительных сывороток, отображает количество инфицированных лиц, которые могут быть выявлены при использовании данной тест-системы. Чувствительность определяется по формуле:

$$\text{Чувствительность} = \frac{I}{I + \Lambda O} \times 100 \%,$$

где П – количество положительных результатов анализа, ЛО – количество ложноотрицательных результатов анализа.

Специфичность – способность тест-системы определять лишь тот компонент, для определения которого она предназначена, т.е. показатель, характеризующий способность диагностикума регистрировать минимальное количество ложноположительных результатов. Специфичность определяется по формуле:

$$\text{Специфичность} = \frac{O}{O + \Lambda П} \times 100 \%,$$

где 0 - количество отрицательных результатов анализа, ЛП - количество ложноположительных результатов анализа.

Таким образом, более чувствительной будет та тест-система, которая дает меньшее количество ложноположительных результатов, а более специфической – та, что дает меньшее количество ложноположительных результатов.

Согласно рекомендациям ВОЗ, CDC (USA, Centers for Disease Control and Prevention), FDA (USA, Food and Drug Administration), чувствительность и специфичность определяется на основании результатов, полученных при тестировании заведомо положительных или отрицательных сывороток стандартных контрольных панелей с последующим вычислением показателей. При этом сыворотки положительных контрольных панелей должны быть охарактеризованы и представлять диапазон от ранней сероконверсии до проявления заболевания, т.е. должны присутствовать как низкотитражные сыворотки, так и сыворотки, содержащие антитела в различных титрах.

Поэтому чувствительность тест-системы можно определять на основании результатов, полученных при тестировании:

- положительных по данной инфекции сывороток на разных стадиях болезни,
- коммерческих панелей (ВВИ, НАВИ, ВСРІ, ГІСК).

Определение специфичности тест-системы проводят при тестировании большого количества сывороток случайно выбранных здоровых лиц с учетом показателей первичной и повторной реактивности положительных образцов в этой тест-системе с последующей верификацией результатов.

Достаточно часто, при определении на стандартных охарактеризованных панелях, чувствительность и специфичность иммунодиагностикумов приближаются или равны 100 %, что в условиях практической лабораторной диагностики невозможно. На сегодняшний день не существует диагностикумов, гарантирующих 100 % чувствительность и специфичность исследований.

Сотрудниками НПК «Диапроф-Мед» совместно с сотрудниками диагностических центров были проведены исследования показателей информативности тест-систем для серологической диагностики сифилиса «DIA-Titer», «DIA-SYPH», «DIA-IgM-SYPH» по сравнению

Необходимо выделить и промаркировать отдельную посуду для работы с растворами хромогена и конъюгатов.

Особенно высокие требования предъявляются к чистоте посуды и наконечников, которые используются для манипуляций с растворами конъюгатов, поскольку даже незначительное загрязнение может привести к падению активности конъюгата и, как следствие, к повышению фоновых значений и снижению чувствительности проведенного анализа.

Подготовка исследуемых образцов

Образцы сывороток или плазмы исследуют после осаждения эритроцитов (центрифугирования). Отделение сыворотки от сгустка эритроцитов и фибрина осуществляют таким образом: пробирку с образцом крови ставят в термостат на 30 мин при температуре 37 °С для быстрого формирования сгустка (фибриноген, который не попал в сгусток, может стать источником ложноположительной реакции в некоторых тест-системах), после инкубации обводят сгусток от стенок пробирки стерильной пастеровской пипеткой и на 1 час ставят в холодильник при температуре 2-8 °С. Пробы центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Такие сыворотки можно хранить 72 часа в холодильнике при 2-8 °С.

Если пробы не удается проанализировать на протяжении срока, указанного выше, их следует заморозить при минус 20 °С или при более низких температурах. При этом нельзя допускать повторного (более 2-3 раз) замораживания и размораживания проб. Размороженные сыворотки, требующие повторного анализа, не следует снова замораживать.

Образцы сывороток должны быть прозрачными, без признаков гемолиза, выраженной гиперлипидемии (хилеза), бактериемии. Не следует проводить ИФА с пробами неопцентрифугированной крови, а также с сыворотками, куда добавлен азид натрия (ингибитор пероксидазы).

Необходимо исключить возможность перекрестного загрязнения проб из-за попадания даже микрочастиц одного образца в соседнюю пробу, что часто наблюдается при проведении любых манипуляций с сыворотками над штативом с пробирками и над рабочим планшетом. Для каждой пробы необходимо использовать отдельный наконечник.

Во избежание ошибок следует внимательно относиться к маркированию образцов.

Таблица 6. Изучение коэффициента вариации в пределах планшета и между планшетами одной серии тест-систем «DIA-Tгер» и «DIA-SYPH»

Характеристика образца	«DIA-Tгер»		«DIA-SYPH»		
	CVп, %	CVм, %	CVп, %	CVм, %	
первичный	1	5,7	7,8	4,3	8,3
	2	5,8	7,9	5,2	7,2
	3	4,9	8,4	4,9	5,3
вторичный	1	6,1	8,2	5,8	6,9
	2	1,6	2,3	1,9	2,1
	3	6,8	8,9	5,5	7,9
скрытый	1	0,9	1,7	1,2	1,9
	2	1,6	2,3	1,5	1,9
K+	11,3	13,5	12,5	15,4	
K-					

Оценку межсерийного коэффициента вариации проводили также с использованием сывороток, перечисленных в таблице 6 на четырех сериях тест-систем «DIA-Tгер» и четырех сериях «DIA-SYPH». При этом для тест-набора «DIA-Tгер» этот показатель составил 7-14 %, а для тест-системы «DIA-SYPH» - 5-12 %.

Требования и рекомендации при проведении исследований методом ИФА

Корректная постановка анализа достигается при обязательном соблюдении перечисленных ниже условий и требований.

Качественная подготовка посуды

Посуда должна быть хорошо вымыта с использованием жидких моющих средств, которые не содержат биодобавок, и тщательно промыта проточной, а затем – дистиллированной водой. Посуду, используемую для приготовления раствора проявителя с хромогеном, нельзя мыть моющими средствами. Такую посуду следует после работы ополоснуть 70 %-ным раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

с традиционными тестами – реакцией связывания компонента и реакцией микропреципитации.

Сравнивая данные, полученные с помощью РСК, МР и тест-набора «DIA-Tгер» видно (см. Таблицу 2), что более чувствительная по сравнению с РСК ИФА тест-система позволяет полнее выявить скрытое носительство трепонем. По данным ИФА, более 80 % сывороток, полученных от лиц, клинически излеченных от сифилиса, дают положительную реакцию на антитела против трепонемы; по данным МР таких случаев оказывается 2/3, а по данным РСК - только около 1/4 часть (сыворотки взяты у 51 больного после окончания курса лечения).

Таблица 2. Сравнительные результаты исследования сывороток на наличие антител против *T. pallidum* при помощи реакций РСК, МР и тест-набора «DIA-Tгер»

Обследуемые контингенты лиц	Количество обследованных лиц	Положительный результат при проведении реакций:			Несовпадения положительных результатов ИФА с результатами других тестов:	
		РСК	МР	ИФА*	МР	РСК
Лица, без постановки предварительного диагноза	88	26	31	32	1	6
Больные с первичным сифилисом	12	6	9	9	0	3
Больные с вторичным рецидивным сифилисом	32	30	31	31	0	1
Больные с вторичным скрытым сифилисом	16	14	16	16	0	2
Лица, находившиеся на прерентивном лечении	2	0	0	0	0	0
Лица после лечения от сифилиса в стационаре	51	14	34	42	8	28

Известно, что РСК дает положительный результат на пятой или шестой неделе после заражения у 25-60 % больных, на седьмой-восьмой неделе – у 75-96 % больных, а на девятой-десятой неделе – у всех инфицированных лиц. Титры антител находятся в пределах от 1:5 до 1:80-1:320. При вторичном сифилисе РСК положительна практически у 100 % больных, а отрицательный результат бывает только в единичных случаях (у ослабленных, истощенных людей с пониженным уровнем иммунного ответа). То же характерно для поздних форм сифилиса [11].

Наши данные доказывают, что повышение чувствительности серологических реакций, обнаруживающих антитрепонемные антитела, явно ухудшает оценку результатов лечения и доказывает необходимость врачебной настороженности и внимательности при последующих осмотрах лиц, клинически излеченных от сифилиса, так как современный сифилис очень многолик и клинически разнообразен.

Полученные результаты свидетельствуют о серорезистентности при сифилисе. Речь идет о так называемых “сифилитическом рубце”, “сифилитическом шраме”, «сифилитической метке», когда серологические маркеры заболевания после клинически удачного лечения длительное время (а иногда и пожизненно) устойчиво сохраняются в сыворотках крови. М.В.Миллих, проанализировавший обширные клинические данные, наблюдал это у 6,2 % всех пролеченных больных (сыворотки которых обследовались тогда без применения ИФА) [12]. Как теперь стало известно в результате многолетних исследований, возбудитель сифилиса *T.pallidum* обладает очень высоким средством к тканям лимфатических узлов, которые играют первостепенную роль в сохранении и развитии сифилитической инфекции в организме человека. Персистенция бледной трепонемы может быть обусловлена присутствием бактерий в иммунологически привилегированных зонах, таких как головной мозг, глаза, куда ограничен доступ циркулирующим антителам и антибиотикам, используемым для лечения сифилиса. Это подтверждается сообщением о развитии сифилитических поражений нервной системы на фоне пенициллинотерапии. В этом случае РСК и другие тесты привычного комплекса серологических реакций обычно отрицательны, а более чувствительные РИБТ и РИФ – или

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{(n-1)}}, d = X_i - X_{cp}$$

где d - разница между отдельными показателями оптической плотности и средней арифметической величиной ($X_i - X_{cp}$); n - количество исследованных сывороток; X_i - оптическая плотность исследуемого образца сыворотки; X_{cp} - среднее арифметическое оптической плотности всех исследованных образцов.

Поскольку при исследовании сывороток показатель стандартного отклонения дает обобщающую характеристику колебаний всех вариантов ОП для данного диагностикума, для сравнения показателей разных тест-систем, определения внутрисерийных и межсерийных отклонений рекомендуется пользоваться коэффициентом вариации (CV), который представляет собой отношение стандартного отклонения к среднему значению, выраженное в процентах.

Коэффициент вариации (CV) рассчитывается по формуле:

$$CV = \frac{\sigma}{X_{cp}} \times 100\%$$

Высокий показатель CV свидетельствует о большей вариабельности оптической плотности на данной тест-системе. Кроме того, исследуют показатели отрицательных и положительных контролей. При этом коэффициент вариации стандартных отклонений от среднего значения положительных и отрицательных контролей не должен превышать 20 %.

Для оценки воспроизводимости результатов анализов тест-систем для серологической диагностики сифилиса «DIA-Тер» и «DIA-SYPH» определяли коэффициент вариации в пределах одного планшета (CVп), между планшетами одной серии (CVм), а также между сериями с использованием двух сывороток от больных первичным, трех образцов от больных вторичным сифилисом, двух – со скрытой формой болезни. В исследованиях использовались также положительные (K+) и отрицательные (K-) контроли тест-наборов. Результаты этих исследований представлены в Таблице 6.

В тест-системах «DIA-SYPH» и «DIA-Tгер» все положительные образцы в составе панели PSS201 выявлялись как позитивные; в тест-системе «DIA-IgM-SYPH» определялись как позитивные лишь восемь образцов, что соответствует паспортным данным панели (14 сывороток не содержали IgM антитела).

Изучение специфичности тест-систем для диагностики сифилиса «DIA-Tгер», «DIA-SYPH» и «DIA-IgM-SYPH» проводили с использованием 2043 образцов сывороток донорской крови, а также на образцах сывороток беременных. В таблице 5 приведены данные по изучению специфичности тест-систем для диагностики сифилиса.

Таблица 5. Изучение специфичности тест-систем «DIA-Tгер», «DIA-SYPH» и «DIA-IgM-SYPH»

Исследуемая группа	Количество образцов	Специфичность, %	
		«DIA-SYPH»	«DIA-IgM-SYPH»
Доноры крови	2043	99,5	99,4
Беременные	197	99,1	99,1

Немаловажным критерием выбором диагностического метода для использования в лабораторной практике является определение воспроизводимости результатов тестирования. Под **воспроизводимостью** понимают близость результатов анализа, выполняемого в различных условиях (в разное время, в разных местах и пр.). При этом различают воспроизводимость тест-набора и межлабораторную воспроизводимость. Величины, характеризующие показатель воспроизводимости – стандартное отклонение и коэффициент вариации, рассчитывают при исследовании панелей положительных сывороток.

Стандартное отклонение или среднеквадратичное отклонение определяется по формуле:

положительны, или отрицательны. Поэтому ИФА может служить хорошим подспорьем при диагностике «приглушенных» инфекций, что особенно важно при проверке донорской крови.

Кроме сравнительного изучения показателей качества иммуноферментной тест-системы «DIA-Tгер» и комплекса серологических реакций, определение чувствительности тест-систем для серодиагностики сифилиса производства «Диапроф-Мед» проводили на образцах сывороток от больных сифилисом на разных клинических стадиях: первичный серонегативный сифилис – 28 образцов, первичный серопозитивный – 27 образцов, вторичный сифилис – 137 образцов, скрытый сифилис – 23 образца, а также на панели сывороток PSS201, содержащей антитела к *Treponema pallidum* в смешанных титрах, производства Boston Biomedica Inc. (США). В таблице 3 приведены данные по определению чувствительности трех тест-систем.

Таблица 3. Изучение чувствительности тест-систем «DIA-Tгер», «DIA-SYPH», «DIA-IgM-SYPH» на сыворотках, полученных от больных сифилисом

Группа больных	Количество образцов	«DIA-SYPH»	«DIA-Tгер»	«DIA-IgM-SYPH»
Первичный серонегативный	28	28	22	25
Первичный серопозитивный	27	27	27	25
Вторичный сифилис	137	137	137	73
Сифилис скрытый	23	23	23	2

При изучении чувствительности тест-систем с использованием сывороток различных групп больных было установлено (Таблица 3), что тест-набор «DIA-SYPH» позволяет определить сифилис на всех стадиях инфекционного процесса. Тест-система для определения IgG антител к *T. pallidum* - «DIA-Tгер» не все сыворотки от больных с

диагнозом первичный сифилис выявляет как положительные, что обусловлено неспособностью этой тест-системы определять специфические антитела класса IgM.

Антитела класса IgM, наличие которых определяли тест-набором «DIA-IgM-SYPH», чаще всего выявлялись у больных первичным и вторичным сифилисом, но практически отсутствовали при исследовании сывороток от больных с латентным протекающим болезнью, то есть антитела данного типа регистрировались на всех острых фазах заболевания, что соответствует волнообразному течению сифилиса.

Возможность применения тест-набора «DIA-IgM-SYPH» для диагностики врожденного сифилиса была исследована на группе образцов от новорожденных, инфицированных T. pallidum. Специфические антитела класса IgM были выявлены во всех 17 образцах этой группы.

Кроме клинического материала, чувствительность тест-систем для диагностики сифилиса изучали на панели образцов плазмы и сывороток крови, содержащих антитела к T. pallidum с различными титрами (BVI Inc.). Результаты иммуноферментного анализа представлены в таблице 4 в виде соотношения оптических плотностей (ОП) образцов к граничному значению (ГЗ). Образцы, для которых соотношение ОП/ГЗ выше 1,0 являются положительными. Кроме результатов ИФА, в таблице приведены (из паспортов данных к панели) результаты тестирования этих образцов в коммерческих тестах - тесте быстрых плазменных реагентов – RPR, реакции иммунофлуоресценции - FTA-ABS (РИФ-абс).

Таблица 4. Изучение чувствительности тест-систем «DIA-Терр», «DIA-SYPH» и «DIA-IgM-SYPH» на панели сывороток PSS201

Номер образца панели	Вест-Дик. RPR <i>Титр</i>	Wampole RPR <i>титр</i>	Zeus FTA-ABS <i>результат</i>	«DIA-Терр» ОП/ГЗ	«DIA-SYPH» ОП/ГЗ	«DIA-IgM-SYPH» ОП/ГЗ
PSS201-01	8	32	Пол.	9.2	17.8	3,4
PSS201-02	2	8	Пол.	10.9	19.4	1.4
PSS201-03	Отр.	Отр.	Пол.	11.1	19.9	0.2
PSS201-04	Отр.	Отр.	Пол.	10.9	19.8	1.7
PSS201-05*	Отр.	Отр.	Отр.	0.5	0.3	0.1
PSS201-06	16	64	Пол.	9.6	19.9	5,4
PSS201-07	1	2	Пол.	10.5	20.0	0.6
PSS201-08	4	8	Пол.	11.6	21.3	0.2
PSS201-09	1	4	Пол.	10.2	23.0	0.4
PSS201-10	4	16	Пол.	12.2	20.9	0.5
PSS201-11	1	4	Пол.	12.1	22.1	0.4
PSS201-12	Отр.	Отр.	Пол.	8.9	21.4	0.3
PSS201-13	4	8	Пол.	10.3	20.7	0.4
PSS201-14	Отр.	Отр.	Пол.	10.4	20.9	0.2
PSS201-15*	Отр.	Отр.	Отр.	0.4	0.3	0.1
PSS201-16	8	32	Пол.	12.7	22.0	1.7
PSS201-17	16	64	Пол.	13.3	22.0	3,6
PSS201-18	8	32	Пол.	12.6	21.6	0.3
PSS201-19	4	2	Пол.	11.3	20.3	0.2
PSS201-20	1	2	Пол.	10.3	21.2	0.2
PSS201-21	8	32	Пол.	8.6	17.6	5,6
PSS201-22	Отр.	Отр.	Пол.	9.6	20.3	0.6
PSS201-23	1	2	Пол.	11.7	20.6	0.3
PSS201-24	1	4	Пол.	11.5	21.8	0.5
PSS201-25	8	128	Пол.	7.3	14.3	6,8

• Образцы PSS201-05 и PSS201-15 являются отрицательными контролями в панели.

• Пол. – положительный Отр. - отрицательный