

Науково-виробнича компанія  
«Діапроф Мед»

**ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА СИФ**  
**Застосування імуноферментного ана**

(Практичний посібник)

УДК 616.972 - 074

Список скорочень, використаних у тексті  
Вступ

"Лабораторна діагностика сифілісу. Застосування сифілісу та його біологічні властивості імуноферментного аналізу" затверджено та рекомендовано до використання особливості сифілісу друку Вченою радою АТЗГ НВК "Діапроф Мед"

Імунна відповідь при сифілісі

Лабораторна діагностика сифілісу

Серологічні методи діагностики сифілісу

Муноферментний аналіз (ИФА) для діагностики сифілісу

Для лікарів-лаборантів медичних закладів, що працюють у лабораторіях імуноферментними тест-системами // Пономаренко В.М. та рекомендації при проведенні досліджень

Раєвська Г.С., Іванська Н.В.

Проблеми, що можуть виникати при проведенні ІФ

Література

Додаток

Київ, "Діапроф Мед", 2004

Скорочення, використані в тексті:

- АГ – антиген;
- АТ – антитіло;
- ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;
- ГЗ – граничне значення;
- ІФА – імуноферментний аналіз;
- К<sup>-</sup> – негативна контрольна проба;
- К<sup>+</sup> – позитивна контрольна проба;
- КСР – комплекс серологічних реакцій;
- МР – реакція мікропреципітації;
- ОГ – оптична густина;
- ОО – оптична одиниця;
- ОФД – ортофенілдіамін;
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;
- РІ(Б)Т – реакція іммобілізації (блідих) трепанів;
- РНІФ – реакція непрямой імунофлуоресценції;
- РІПФ – реакція прямої імунофлуоресценції;
- РФК – реакція фіксації комплекменту;
- ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;
- ВВІ – компанія «Boston Biomedica Inc.»;
- СІС – Центри США з проблем контролю та захворювань;
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазний імуноферментний аналіз;
  - IgG, IgM, IgA – імуноглобуліни класів G, M, A;
  - RPR (rapid plasma reagin) test – тест на визначення реактивності плазми;
  - VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) test – тест на визначення вмісту реактивних веноеричних хвороб.

## Вступ

Сифіліс – широко розповсюджене інфекційне захворювання, викликане *Treponema pallidum*. Хвороба характеризується пошкодженнями шкіри, слизових оболонок внутрішніх органів, кісток та нервової системи. Сифіліс притаманна зміна періодів загострення прихованими стадіями хвороби. За даними ВООЗ, збудник сифілісу щороку заражає 12 млн чол. [1]. Зараження відбувається переважно статевим шляхом, але можлива також передача через плаценту (вроджений сифіліс), при побутових контактах (побутовий сифіліс) та при переливанні крові (гемотрансфузійний сифіліс інфікування) та випадково – при інших медичних маніпуляціях (через незнезаражений інструмент).

Останнім часом сифіліс характеризується високим рівнем захворюваності, але й переважають форми інфекції, нетиповим перебігом захворювання збудника проти лікувальних препаратів, звичайно у клінічній практиці. У зв'язку з цим набуває значення своєчасне виявлення хворих на сифіліс населення, запобігання зараженню, зокрема, тому беззастережного обстеження крові донорів на маркери сифілісу крові; тому законодавчі акти багатьох країн

лабораторної діагностики сифілісу, ч. І

**Збудник сифілісу та його біологічні властивості** дерматовенерології. – 1996. – № 3. – С. 33-3

р. Шаудінном та Гоффманом, належить до роду *Spirochaeta*. *T. pallidum*, чи бліда трепонема – це облигатний паразит, якому притаманна висока спорідненість до тканин лімфатичних вузлів, внутрішньоклітинний паразит, якого притаманна висока спорідненість до тканин лімфатичних вузлів, лабораторної діагностики сифілісу, ч. І

### Процедура

- Внесення в лунки стрипів по 100 мкл розчину проязвника (перекису водню та хромогену)
- Інкубація 30 хв при кімнатній температурі (поява забарвлення лунках з позитивними зразками)
- Зупинка реакції, додано стоп-реагент
- Реєстрація оптичної густини

Форми бактерій розташовуються в периглазмати́чній ділянці мембрану Форми бактерій та L-форми третіонем, виникають під дією лікувальних препаратів. Додатковий оболонки забезпечує несприятливих впливів, і тому зберігається в організмі протягом усього життя. Біологічні властивості збудника визначають перебіг хвороби, а при відсутності лікування – хронічний інфекційний процес [2].

**Клінічні особливості сифілісу**  
Сифіліс – системна інфекція, при якій проявляються чергуються з прихованими періодами міжнародною класифікацією хвороб «МКХ Х», розподілені на клінічні стадії сифілісу:

#### Уродженний сифіліс

- Ранній вроджений сифіліс з симптомами
- Ранній вроджений сифіліс прихований
- Ранній вроджений сифіліс не чітко класифікований
- Пізнє вроджене сифілітичне пошкодження
- Пізній вроджений нейросифіліс
- нейросифіліс]

- Інші форми вродженого сифілісу
- Пізній вроджений сифіліс прихований
- Пізній вроджений сифіліс не чітко класифікований
- Уродженний сифіліс не чітко класифікований
- Ранній сифіліс

Первинний сифіліс статевих органів

Нейросифіліс не чітко класифікований

Інші симптоми пізнього сифілісу

Пізній сифіліс прихований

Пізній сифіліс не чітко класифікований

Інші не визначені чітко форми сифілісу

Прихований сифіліс, не чітко визначений, як ранній, так і пізній.

Інкубаційний період при сифілісі триває 3-4 тижні. Хвороба розпочинається з утворення шанкру – округлої виразки, з якої виділяється прозора рідина, що містить трепонеми. Через 20-30 днів шанкр зникає і ноді залишаючи шрам. Це стадія первинного сифілісу. При вторинному сифілісі трепонема поширюється в організмі через кровоносну та лімфатичну системи, спричиняючи пошкодження шкіри та слизових оболонок, а також поладенопатію. Далі настає прихована стадія та зникають клінічні симптоми вторинного сифілісу. Наступна стадія – пізній сифіліс, який супроводиться ураженнями внутрішніх органів – серцево-судинної, нервової, кісткової систем, шкіри та слизових оболонок; усе це може викликати смерть від сифілісу.

Уроджений сифіліс виникає внаслідок зараження плоду під час вагітності. У заражених вагітних жінок трепонеми проникають через хоріоальні ворсинки плаценти на 5-му місяці вагітності. Якщо зараження трапилося наприкінці вагітності, то інфекційний процес розвивається в новонароджених так само, як і в дорослих осіб (за винятком ураження серцево-судинної системи). Не виключено можливість прихованого та тривалого безсимптомного перебігу інфекції, яка діагностується в дитини лише за позитивними серологічними реакціями [2].

## «DIA-IgM-SYPH»

імуноферментна тест-система для визначення антипротигубуника сифілісу Treponema pallidum

## Етапи проведення імуноферментного аналізу

### Процедура

Полістиролові стрипи, сенсйбілізовані антитілами проти IgM людини

Внесення в лунки стрипів по 90 мкл розведеного сироваток та по 10 мкл зразків контролю сироваток  
Інкубація 30 хв при 37 °С (формування IgM)

Промивання лунок буферним розчином 4 рази

- Внесення в лунки стрипів по 100 мкл розчину (перекису водню та хромогену)
- Інкубація 30 хв при кімнатній температурі (поява лунках з позитивними зразками)
- Зупинка реакції, додано стоп-реагент
- Реестрація оптичної густини

відповіді після проникнення блідої трепонеми в о частку макрофага. Т-лімфоцити та В-лімфоцити функціонують в організмі з бактеріями, призводять неспецифічної фагоцитарної реакції за допомогою дендрних лейкоцитів та мононуклеарних моноцитів та тканинних макрофагів, що захоплення мікроорганізмів, а також процесинг їхніх антигенів і мунокомпетентним клітинам. У реакції можуть брати участь також «непрофесійні» клітини, фібробласти, перитити нерві ендотеліоцити каплярів), в яких відбувається трепонем у фаголізосомах. Отже, фагоцитоз незавершеною програмою; тому організм не зник який зберігає вірулентність при ендоемітобіозі, а л ізолює трепонем. У відповідь на стимулювання моноцитарного ряду підвищують синтез інтерферонів. Внаслідок їхнього впливу активується Т-лімфоцитів, що локально діють збудника, та запуск диференціації В-лімфоцитоплазматичні клітини, які виробляють анти-rallidum [3].

Першими після інфікування T.rallidum специфічні антитіла класу IgM, що реєструються тижня після зараження та досягають найвищого рівня 6-9 тижні. Виявлення специфічних антитіл класу найбільше значення для виявлення вродженого сифілісу великі молекули IgM не проходять через плаценту знаходження їх у крові новонароджених внутрішньоутробне зараження сифілісом. На чет після зараження організм починає синтезувати

## «DIA-SYPH»

імуноферментна тест-система третього покоління для визначення антитіл проти збудника сифілісу Treponema pallidum

Рис. 1

Після успішно проведеного лікування кількість антитіл класу IgG у крові поступово падає, але в деяких осіб, що перехворіли на сифіліс, імуноглобуліни цього класу можуть зберігатися тривалий час та виявлятися за допомогою високочутливих реакцій – РІФ, РІБТ, імуноблотингу та ІФА. Існують деякі особливості гуморальної відповіді при сифілісі, обумовлені структурою збудника, а саме тим, що блда трепонема містить приблизно в 100 разів менше імуногенних білків, пов'язаних із зовнішньою мембраною, ніж типові грам-негативні мікроорганізми [5]. Найперспективнішими для діагностики вважаються ліпопротеїни з молекулярними масами 15, 17, 41-45 та 47 кДа (p15, p17, TmpA та p47). По-перше, названі антигени видоспецифічні, тобто характерні лише для патогенної трепонеми. По-друге, антитіла в крові хворих на сифіліс виявлено проти кожного з цих білків, що свідчить про їхню високу імуногенність.

Білок p17, який належить до внутрішньої мембрани протоплазматичного циліндра Treponema pallidum, викликає найактивніший синтез антитіл, особливо на стадії вторинного сифілісу; тому цей компонент назвали «основним мембранним білком». Разом з ліпопротеїном p15 його можна успішно використовувати для диференційної діагностики сифілісу та Лайма (так званого кліщового бореліозу, або кліщового спірохетозу) Білок p47 так званий антиген що зв'язує

Етапи проведення імуноферментного аналізу

Етапи проведення імуноферментного аналізу

### Процедура

Полістиролові стрипи, сенсйбілізовані білками

Внесення в лунки стрипів по 60 мкл розчину зразків контролю та сироваток зразків пацієнтів при 37 °С (формування комплексу антиген-антитіло з кон'югатом)

Промивання буферним розчином (8 разів)

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Внесення в лунки стрипів по 100 мкл розчину проявника (перекису водню та хромогену)</li> <li>• Інкубація 30 хв при 37 °С (забарвлення)</li> <li>• Зупинка реакції, додано стол-реагент</li> <li>• Реєстрація оптичної густини</li> </ul>	<p><b>Лабораторна діагностика сифілі.</b></p> <p>Методи діагностики сифілісу традиційно групи – <u>прямі методи</u>, <u>направлені на виявлення непрямі</u> – серологічні тести для визначення антитілов трепонеми.</p> <p>Донедавна <u>основним лабораторно-підходом при виявленні первинного сифілісу</u> <u>мікроскопіі в темному полі</u> мазків, узятих</p>
---	--

поверхневих осередків розвитку трепонем (шанкр слизових оболонок, на поверхні папул тощо). годиться для всіх видів «блідих» мікроорганізмів, заломлюють світло, включаючи й сапрофітні. Результати, отримані даним методом, можна використовувати для діагностики сифілісу. Реакцією прямої імунофлуоресценції (РІФФ), коліметричним, люмінесцентного мікроскопа помітні спіралевидні обolonки яких свіяться після обробки даних препаратів антигітлами проти трепонем, якщо ці антибіотики не використовували. Однак не завжди можна виявити хворих з прихованими формами сифілісу, можна використовувати інші методи досліджень [7].

Сучасні методи виявлення збудника сифілісу визначенні в досліджуваних зразках специфічними методами послідовностей нуклеїнових кислот T.pallidum. Наприклад, з них метод полімеразної ланцюгової реакції – ПЛР (PCR, chain reaction), в основі якого лежить реплікація ДНК, відбувається розпітання подвійної спіралі ДНК, виділення ланцюгів та комплементарна добудова обох ланцюгів та синтез нових ланцюгів (ПНК). Чутливість ПЛР об'єктивна.

спеціально обладнані приміщення, кваліфікований персонал, високоякісне й недешеве обладнання та високоочищені реактиви (особливо праймери).

Через біологічні властивості T.rallidum спроби вирощування ферментна тест-система для визначення антигену її поза живими клітинами довго не мали успіху, хоча є вже перші спроби проти збудника сифілісу Геронета rallidum відомості про розмноження цього мікроорганізму на живильному середовищі in vitro. Звичайно збудник сифілісу добре розвивається в організмі кролів, але хвороба в цих тварин триває протягом 3-6 місяців, а тому метод біологічної проби високочутливий, мало годиться для повсякденної клінічної практики.

Таким чином, через обмеження, притаманні прямому виявленню в клінічних пробах T.rallidum генетичного матеріалу, ці методи не завжди придатні та доступні для лабораторної практики. Тому для діагностики сифілісу широко застосовують непрямі (серологічні) тести.

### Серологічні методи діагностики сифілісу

Сучасні серологічні методи діагностики сифілісу складаються з трепонемних та нетрепонемних тестів. У нетрепонемних тестів використовують явище так званої антигенної мімікрії. Суть явища полягає в тому, що непреривній еволюції живих організмів та процесові горизонтальної передачі генетичної інформації клітинна T.rallidum містить ряд амінокислотних послідовностей (епітопів), спільних з епітопами таких «небактеріальних» сполук, як кардіоліпін (його звичайно виділяють з серцевого м'яза бика), лецитин та холестерин. До нетрепонемних тестів належить, зокрема, реакція фіксації комплекменту (РФК) – аналог реакції Вассермана. Аналіз сироватки проволять за допомогою

## «DIA-Trep»

### Етапи проведення імуноферментного аналізу

#### Процедура

методам  
чи її  
доступні  
сифілісу  
білками

сифілісу  
випадку

Внесення в лунки стрипів по 80 мкл розчи  
проб та по 20 мкл проб контролів та сироват  
Інкубація 60 хв при 37 °С (формування  
антитіло)

Промивання лунок буферним розчином (4

мікропреципітації (MP). При зараженні людини преципітат утворюється внаслідок взаємодії антитрепонемними антителами сироватки кардіоліпіним антигеном. За кордоном в аналогії MP: VDRL-тест (за назвою лабораторії запропоновано тест – Veneral Disease Research Laboratory для визначення активних реактивів – USR (ultra-reagins); тест для виявлення швидких реактивів і (rapid plasma reagins); тест з толуїдиновим непрямою сироваткою – TRUST (toluidin red test).

У тесті VDRL використовують свіжж кардіоліпінимий антиген та інактивовану сироватку при механічному обертанні. У тесті USR використовують нативну плазму та антиген, стабілізований холодною ЕДТА (такий антиген можна не готувати щодня) утворюються при цих реакціях, видно під мікроскопом RPR та TRUST для візуального обліку використовують активоване вугілля чи азобарвник.

Характеристики неспецифічних тестів дуже недостатньо чутливі, особливо на початку захворювання; при роботі з ними доводиться використовувати для кожної проби окремо підміну візуально, що призводить до суб'єктивних оцінок великої кількості хибно-позитивних результатів. Тест часто трапляються при системних та захворюваннях, багатьох вірусних інфекціях (мононуклеоз), захворюваннях сполучної тканини, та вакцинаціях, а також в осіб літнього віку. Крім позитивні реакції реєструються при нелугах з

сифілітичну інфекцію.

Однією з перших серологічних реакцій для визначення в антитіл проти *T. pallidum* була реакція іммобілізації (Борнштайн) трепонеми [Рі(Б)Т чи РІТ], запропонована R.Nelson та M. Murchau 1949 р. Метод базується на уповільненні руху трепонеми шлясту впливом сироватки крові осіб, хворих на сифіліс. (Рейдінг) високоспецифічна, бо тут використовують як антиген суспензію слабке блідих трепонем, отриманих з тканин при сифілітичному зараженні кролів. Однак саме трудності, пов'язані з виготовленням антигену, обумовлюють обмежене застосування трепонного централізованих лабораторіях. Серед недоліків РІБТ слід зазначити ОГ вказати недостатню її чутливість на стадії первинного сифілісу коли рівень антитіл (зокрема, IgM) недостатній для реєстрації не позитивного результату.

Більш поширений трепонемний тест – реакція неспецифічного імунофлуоресценції (РІФ, Fluorescent Treponemal Antibody Test) яка в багатьох країнах вважається “золотим стандартом” при апробації нових методів діагностики. Для дослідження патогенні бліді трепонеми (штам Nichols) фіксують на предметному склі, обробляють розведеною досліджуваною сироваткою чи спинномозковою рідиною, а потім антитілами проти людських імуноглобулінів класів G та/чи M, мічених флуоресцеїном. Мічений комплекс утворюється на поверхні трепонеми. Звичайно в клінічних лабораторіях при постановці РІФ-абс для розведення сироватки беруть екстракт непатогенних культуральних трепонем штаму Reiter, що сприяє видаленню неспецифічних антитіл та посиленню специфічності реакції.

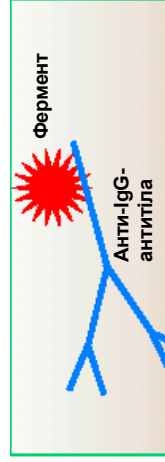
Найпростіші для постановки реакції базуються на принципі гемаглютинації (реакція пасивної гемаглютинації, РПГА; *T pallidum* hemagglutination assay (ТРНА) що не потребують

Немає	4.2. Не внесено один із реагентів – сироватку, кон'югат або провяник.	4.2.1. Перест проби. Вне до "Інструкції реагенти."
Слабке зараження в сифілітичному зараженні кролів. Однак саме трудності, пов'язані з виготовленням антигену, обумовлюють обмежене застосування трепонного централізованих лабораторіях. Серед недоліків РІБТ слід зазначити ОГ вказати недостатню її чутливість на стадії первинного сифілісу коли рівень антитіл (зокрема, IgM) недостатній для реєстрації не позитивного результату.	5.1. Зменшено час інкубації.	5.1.1. Інкубація згідно з "Інструкцією"
Більш поширений трепонемний тест – реакція неспецифічного імунофлуоресценції (РІФ, Fluorescent Treponemal Antibody Test) яка в багатьох країнах вважається “золотим стандартом” при апробації нових методів діагностики. Для дослідження патогенні бліді трепонеми (штам Nichols) фіксують на предметному склі, обробляють розведеною досліджуваною сироваткою чи спинномозковою рідиною, а потім антитілами проти людських імуноглобулінів класів G та/чи M, мічених флуоресцеїном. Мічений комплекс утворюється на поверхні трепонеми. Звичайно в клінічних лабораторіях при постановці РІФ-абс для розведення сироватки беруть екстракт непатогенних культуральних трепонем штаму Reiter, що сприяє видаленню неспецифічних антитіл та посиленню специфічності реакції.	5.2. Термін придатності тест-системи закінчився.	5.2.1. Результати тестування з належним придатності



результатів. Застосування технології рекомбінантних ДНК, включаючи клонування, експресію генів та виділення рекомбінантних трепонемних антигенів, дали поштовх до створення тест-систем нового покоління. Проте при роботі з тест-системами на основі таких антигенів виникає небезпека, що імуносорбенти, до складу яких входять аналоги не всіх, а лише деяких антигенних детермінант, можуть не охопити всього спектру антитіл, які утворюються при зараженні *T. pallidum*. Тому ряд спеціальних досліджень направлено було саме на виявлення цих антигенів та імунодомінантних епітопів; внесення їх до складу імуносорбенту дає змогу значно підвищити чутливість ІФА [10].

Щоб досягти високих діагностичних характеристик імуноферментної тест-системи, слід не лише оптимізувати склад імуносорбенту, але й використати високоспецифічний противидовий кон'югат. Він може включати моно- чи поліклональні антитіла проти людських імуноглобулінів класів G та/чи M людини, кон'югованих з ферментом. Слід зауважити, що в деяких тест-системах такого типу використовують мічений ферментом рекомбінантний білок А (аналог білку А *Staphylococcus aureus*) як компонент, що зв'язує сироваткові антитіла. Такий кон'югат дає змогу виявляти антирепонемні імуноглобуліни лише класу G (підкласи IgG1, IgG2, IgG4).



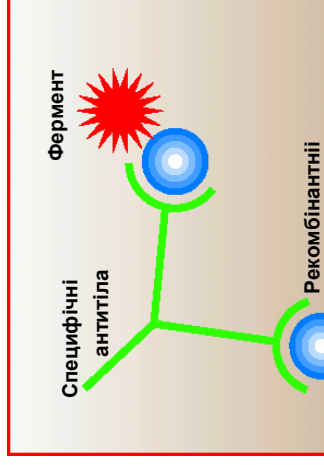
	1.5. Наявність і використання на робочому місці дезрозчинів, що містять хлор.	1.5.1. Не виконувати збирання та зберігання місць приміщення, що проводяться методом ІФА.
1.6. Повторне використання наконечників.		1.6.1. Наконечники використовувати одноразово.
1.7. Контакт хромогену з металами (пінцет, скальпель тощо).	3	1.7.1. Усунути хромогену з хромогену з
1.8. Зменшено кількість циклів промивок планшету.		1.8.1. Промивати згідно з "Інструкцією".
1.9. Закінчився термін придатності тест-системи.		1.9.1. Заборонено використання системи.
1.10. Забруднений посуд.		1.10.1. Мити дезінфікувати відповідно "Інструкції".
1.11. Підвищено температуру або продовжено термін інкубації.		1.11.1. Дотримуватися режиму інкубації.
2.1. Переливання		Відрегулювати

2. Високий

## ПРОБЛЕМИ, ЩО МОЖУТЬ ВИНИКАТИ ПІРІ ПРОВЕДЕННІ ІФА

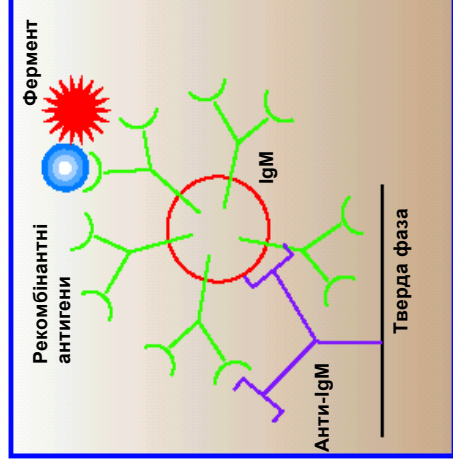
Рис. 2

Проблеми, що виникають	Можливі причини	Засоби усунення проблем
1. Високий фон (забарвлення) в лунках всього планшету.	1.1. Низька якість дистильованої води.	<p>антитіла, що зв'язалися з антигенами на поверхні клітин, що заважає за допомогою кон'югату, до складу якого входить антиген, які використано в складі імуносорбенту. Після цього можна знайти в сироватці крові хворих протітільні антитіла, які зв'язалися з антигенами на поверхні клітин, що заважає за допомогою кон'югату, до складу якого входить антиген, які використано в складі імуносорбенту.</p> <p>1.1.1. Промити дистильованою водою лабораторні скляні посудини, а потім знову дистильованою водою.</p> <p>1.1.2. Прокристалит дистильовану воду в холодильнику протягом 10-15 годин, а потім відкритий посудини протягом 10-15 годин, а потім використати в експерименті.</p> <p>1.1.3. Використовувати дистильовану воду спеціального виробництва.</p>
	1.2. Бактеріальне забруднення води.	<p>У більшості випадків забруднення води відбувається внаслідок використання нестерильної води. Для усунення цієї проблеми необхідно використовувати стерильну воду.</p> <p>1.2.1. Зберігати дистильовану воду в закритому посуді.</p> <p>1.2.2. Дистильовану воду використовувати протягом дня.</p>
	1.3. Забруднений промивач (вошер).	<p>1.3.1. Почистити голівку промивача за допомогою голки та промити її 30 % розчином етилового спирту, а потім кілька разів дистильованою водою.</p>



полістиролових планшетх. При інкубації досліджуваного зразка з матеріалу IgM-антитіла приєднуються до противидових антигенів заморожування планшета зі зразками після р на твердій фазі, а специфічні серед них далі виявляються в розчин проявника та швидке р допомогою кон'югату, який містить пероксидазу хромогенного дня при кімнатній температурі перед вим рекомбінантні та/або синтетичні білки-аналоги антигенів (Сміддіоїам'ятати, що ОГ все-таки зростає, а відно трепонеми. Схему такої модифікації ІФА представлено на рисунку 4. Ця схема проведення ІФА для визначення призначення буде більшим для невисоких значень ОГ. специфічних ІgM має ряд переваг над непрямыми ІгМ, присутність яких у вразковій рідині при несправному термост застосовуваним для цієї мети:

- при виявленні специфічних ІgM, присутність системи реагують на пониження температури сироватці, ІgG не конкурують за місце зв'язування з антигеном, а тому немає специфічним антигеном, як то відбувається у вразковій рідині при несправному термост непрямого ІФА;
- немає неспецифічної взаємодії, обумовленої присутністю ревматоїдного фактора.



дистильованою водою, не допускаючи утворення осадурезультатів. промивного розчину та забруднення каналів промивної системи.

Щотижня слід знезаражувати промивач 30 %-ним розчином аблиця 1. Результати визначення антитіл проти етилового спирту, а потім 5 разів промити дистильованою водою. та можлива інтерпретація отриманих

Спектрофотометри багатоканальні (ридери, імунофлуоресценція) визначеність специфічних антитіл проти аналізатори) T. pallidum

Спектрофотометри використовуються для автоматичної реєстрації результатів ІФА, а тому необхідно періодично (щодня) проводити метрологічний контроль. Метрологічна перевірка забезпечує правильність отримуваних результатів.

У повсякденній практиці ІФА слід не забувати про те, що для виходу на робочий режим прилад має прогрітися (час прогрівання для кожного конкретного приладу вказано в інструкції до нього). Є прості засоби для перевірки точності роботи спектрофотометра.

Щоб перевірити відтвореність спектрофотометричної оцінки результату в кожній лунці планшета, необхідно декілька разів повторити визначення ОГ в тих самих лунках планшета.

Щоб оцінити рівномірність результатів вимірювання по всій як поверхні планшета, слід в усі лунки порожнього чистого планшета внести однаковий об'єм забарвленого розчину. Такий розчин виготовувати, додавши до розчину проявника (його ідентифікувати відповідно до інструкції для даної тест-системи) невелику кількість пероксидазного кон'югату. Кількість кон'югату при підбиранні розчину лежала в інтервалі від 0,3 до 1,0 оптичної одиниці. Після внесення такого розчину в усі лунки планшета та дозрівання стоп-реагента проводять спектрофотометричне вимірювання. Відхилення від середнього результату вимірювання в межах доцільно вибирати планшета не повинне перевищувати 5 %.

Для більш коректної оцінки результатів ІФА слід працювати з вторинного рецидивного сифілісу можна вдатися

T. pallidum		IgM	Сумарні антитіла (IgM, IgG, IgA)	Ранні початки
ІгМ	Сумарні антитіла (IgM, IgG, IgA)			
+	+	+	+	Ранні початки
+	+	+	+	Завершено
-	-	-	+	Можливо сифіліс

відно з таблиці 1, на стадії сифілісу доцільно скористатися антитілами класу IgM чи сумарних антитіл ранньої діагностики захворювання перше визначення специфічних IgM за допомогою ІФА. Виявлення сироваткових антитіл до ІФА. Визначити активність інфекційного процесу (ІФА) IgM у сироватках заражених осіб при гострому сифілісу, а серологічно ці дві форми важко відрізнити. Первинного серопозитивного, вторинного рецидивного сифілісу можна вдатися



що якість відмивання планшета – це один з основних факторів при проведенні ІФА, тому до цього треба ставитися дуже уважно. При проведенні лабораторних досліджень необхідно стежити за рівномірністю заповнення лунки і питанні про вибір тест-системи. Необхідно рідини з усіх лунок планшета. Проміжок чапратіжкою, для оцінки якості та придатності заповнення лунок розчином для промивання та видалення рідини використовують наукові, медичні та економічні критерії вибору методу включують визначення специфічності та відтворюваності діагностикумів.

#### Правила роботи з кон'югатами та проявником

Для внесення кон'югату та проявника слід мати окремі **Чутливість** – показник, що характеризує мікропіпетки та ванночки з позначками, що їх використовують **Чутливість** виявляти максимальну кількість істинних сироваток, вказує долю інфікованих осіб, яку можна виявити в тест-системі. Чутливість і

Слід виключити можливість контакту проявника з синтетичними засобами для миття та з хлорамином. Тобто

роботи з проявником необхідно брати окремих посуд та наконечники. Дезинфекцію інструментів та допоміжних матеріалів слід проводити 6 %-ним розчином перекису водню чи 70 %-ним етиловим спиртом.

Неприпустимий контакт таблеток ОФД та розчину також готового розчину проявника з металами.

Розчин проявника безпосередньо перед його застосуванням має бути прозорий та безколірний. Планшет з внесеним субстратом та хромогеном слід тримати в темряві. Рештки розчину у ванночці не рекомендують виливати до закінчення інкубації планшета проявником. Проявник, що лишається у ванночці, має лишатися незабарвленим протягом 30 хв; поява забарвлення у ванночці з проявником свідчить про його забруднення.

$$\text{Специфічність} = \frac{H}{H + XH} \times 100\%$$

Періодичний контроль роботи обладнання – кількість негативних результатів аналізу, Важливий фактор, що впливає на проведення ІФА – кількість позитивних результатів аналізу. Важливий фактор, що впливає на проведення ІФА – кількість позитивних результатів аналізу. Таким чином, чутливішою буде та тест-система, яка дає менше негативних результатів аналізу.

позитивних чи негативних стандартних контрольних панелей (воложення). Таким чином наконечник наступним обчисленням показників. При цьому сироватку розмішувати. Повторіть цю процедуру 2-3 рази. Позитивних контрольних панелей мають бути охарактеризовані. Наостанку натисніть операційну кнопку та отримані як від хворих з ранньою сероконверсією, так і відерепони для повного звільнення наконечника осіб з різними проявами хвороби; це значить, що до набору витягніть наконечник з розчину і відпустіть. мають входити як низькотитражні сироватки, так і сироватки знопу в початкове положення.

вищими титрами антитіл.  
Тому чутливість тест-системи можна встановити допомогою механізму для зняття наконечника з основи результатів, отриманих при тестуванні.

- набору сироваток, позитивних щодо даної інфекції та наступним зразком біологічної рідини.
- взятих від заражених осіб на різних стадіях При роботі з сироватками чи іншими рідинами захворювання;
- комерційних панелей (ВВІ, NABІ, ВСРІ, ГІСК) наконечника, і це може змінити об'єм піпетованої

Визначення специфічності тест-системи здійснюють за допомогою порівняння зразків, які описано вище. тестуванні великої кількості сироваток випадково випадково випадково випадково випадково випадково клінічно здорових осіб, враховуючи показники первинної інфекції. Якщо змочити наконечник у піпетці повторної реактивності позитивних зразків у цій тест-системі з наступною верифікацією результатів.

Достатньо часто, при визначенні чутливості на Температурний режим та час інкубації специфічності імуноферментних чи інших тест-систем. При проведенні аналізу температура в лабораторних стандартних охарактеризованих наборах сироваток ці показники.

наближаються чи досягають 100 % – результатів, неможливих як правило, інкубація досліджуваних сироваток умов практичної повсякденної лабораторної діагностики проводиться в термостаті. Для рівномірного прогресу. Сьогодні немає діагностикумів, які гарантували б абсолютну чутливість поліцію термостату та специфічність досліджень.

паперу.

Інкубацію проб з різним проявником, що містить діагностичних центрів провели дослідження показників при кімнатній температурі. При інформаційності тест-систем «DIA-Titer», «DIA-SYPH» та «DIA-Titer» порівняно з температурою 18-25 °С. Сама на неї розраховано тривалість «DIA-SYPH» для серологічної діагностики сифілісу порівняно з інструкції. Якщо температура в кімнаті

4. У ході роботи тримайте піпетку вертикально від вертикалі 10°). (максимальне відхилення від вертикалі 10°).

5. Для кращої роботи щільно тримайте піпетку в руці, великий палець має лежати на операційній кнопці. Послідовність роботи при внесенні біологічної рідини в буфери для розведення зразків показано на рисунках 6 та 7.

Початкове

положення

Перший упор

Другий упор

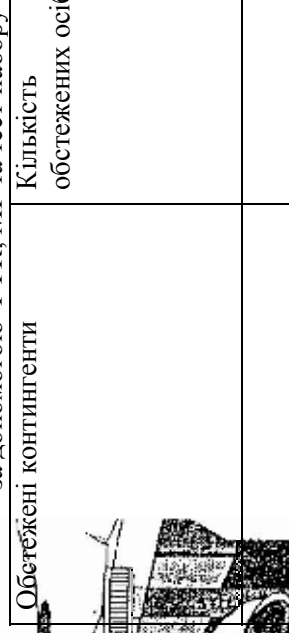
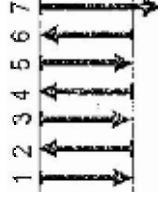


Рис.6

- Занурте наконечник на 2-3 мм в біологічну рідину, натисніть на операційну кнопку до першого упору (рис.6) і плавно відпустіть кнопку.
- Не витягаючи наконечника з рідини, обережно відіть кнопку у початкове положення.
- Занурте наконечник на 2-3 мм у розчин, куди перенести набрану рідину, натисніть на операційну кнопку до першого упору. Уникайте дотиків наконечника до та дна лунок (рис.7).



Таблиця 2. Порівняльні результати до

сироваток

на наявність антитіл проти Т. pallidum за допомогою РФК, МР та тест-набору

Обстежені контингенти	Кількість обстежених осіб
Особа, обстежена без попереднього цитозу	88
Хворі з первинним сифілісом	12
Хворі з вторинним рецидивним сифілісом	32
Хворі з вторинним прихованим сифілісом	16
Особа, що знаходиться на превентивному лікуванні	2
Особа після лікування від сифілісу в стаціонарі	51

Наші дані доводять, що підвищення чутливості вносячи контрольні та досліджувані проби, серологічних реакцій, які виявляють антитіла проти трепаном, доводять, що трепаном у суміш у лунках. достеменно погіршує оцінку результатів лікування та доводить, якщо при внесенні аналізованої проби трапляється необхідність сторожкого та уважного підходу при настанні складу, дві сироватки внесено в ту саму лунку) обстежених осіб, клінічно вилікуваних від сифіліту, від сифіліту, що лунку як «брак» у протоколі внесе сучасний сифіліс дуже розмаїтій та клінічно проявляється, якщо уваги отриманий у ній результати.

Реакція приєднання антитіл до антигену почи Отримані результати свідчать про серорезистентність після внесення сироватки в лунку планшета, то сифіліс. Йдеться про так званий «сифілітичний рубець», зменшити час поміж початком та закінчення «сифілітичний шрам», «сифілітичну мітку», коли серологічні маркери захворювання після клінічно вдалого лікування наступні маніпуляції з планшетом (внес тривалий час (а іноді й усі життя) стійко зберігаються, проявника та стоп-реагента) слід сироватках крові. М.В.Мілич, який проаналізував великий добірною багатоканальної піпетки, починаючи вно клінічних даних, спостерігав таке в 6,2 % усіх пролікованих, з котрого починали вносити сироватки. вно хворих (сироватки їхні досліджувались тоді без застосування закінчили роботу, слід занести в протокол ІФА) [12]. Як тепер стало відомо внаслідок багатопланшета (вклеїти розпечатку з рідерного принтера) досліджень, збудникові сифілісу Treponema pallidum притаманна лабораторія отримує документ, зручний для зберігання висока спорідненість до тканин лімфатичних вузлів введено дослідження.

Правила роботи з автоматичною піпеткою в організмі людини. Тривале переживання блідої трепонеми часто обумовлене присутністю бактерій у зонах, та коли на широкі застосовуються для взяття та роз головного мозок, очі, куди обмежено доступ антибіотиків, сироватки рідини. Принцип дії піпетки – переміщення переноситься з кров'ю, та антибіотикам, які використовуються повітря між поршнем та рідиною. Для взяття для лікування сифілісу. Це підтверджують клінічні дані, сироватки рідини використовують змінні наконечники наростання сифілітичних уражень нервової системи на фоні в штативі. Піпетки обладнано механізмом пеніцилінотерапії. У таких випадках РФЖ та інші наконечників. Піпетки обладнано механізмом традиційного КСР дають звичайно негативну відповідь, а більшість роботи з автоматичною піпеткою допри чутливій РІБТ та РІФ – чи позитивну, чи негативну. Тому ІФА/РІФ може бути допомогою при діагностиці «пригнічених» Встановить потрібний об'єм як вказано в

слід обов'язково знезаражувати та утилізувати.

Не можна використовувати для аналізу компоненти з різних серій, бо всі компоненти тест-системи та умови аналізу (зокрема, робоче розведення кон'югату) виробником для кожної серії наборів.

Дотримання інструкції щодо правил роботи в лабораторних приміщеннях, де зберігаються тест-системи та проводяться дослідження методом ІФА

Неприпустима присутність на робочому місці в лабораторії парів окислювачів (відкритих посудин з розчинами перекису водню, гіпохлориту тощо). Не дозволяється зберігати та використовувати розчини з хлором у приміщеннях, де в цей час проводять дослідження методом ІФА.

Таблиця 3. Вивчення чутливості тест-систем «DIA-Тер», «DIA-SYPH» та «DIA-SYPH» на сироватках, взятих у хворих на сифілісом

Кількість зразків	«DIA-SYPH»	«DIA-SYPH»
28	28	28
27	27	27
137	137	137
23	23	23

Дотримання термінів та умов зберігання наборів

Якісна робота з діагностичними наборами гарантується виробником лише в межах вказаного терміну придатності набору. Дотриманні відповідних умов зберігання.

При вивченні чутливості тест-систем з різних груп від хворих різних груп (Таблиця 3) показує, що «DIA-SYPH» дає змогу встановити наявність інфекції на всіх стадіях процесу. Тест-система дає змогу встановити наявність антител проти T.pallidum – «DIA-SYPH»

Загальні рекомендації для якісного проведення аналізу сироватки від хворих з діагнозом первинного сифілісома  
Оскільки при постановці ІФА одночасно досліджують велику кількість проб, їх можна перешлугати при внесенні в одну планшету. Щоб цьому запобігти, рекомендують до початку аналізу Антитіла класу IgM, наявність яких виявляють заповнити протокол дослідження, де на схемі планшета показано розведення «DIA-IgM-SYPH», найчастіше виявляють плановану послідовність внесення проб. Така схема дозволяє встановити первинний сифілісом, але лабораторії зосереджено працювати з первинним сифілісом, але

сироваток крові (фірми BVI Inc.), які містять антитіла проучту еритроцитів та фібрину здійснюють таким чином у різних титрах. Результати ІФА представлено в таблиці у термостат на 30 хв при температурі 4 у вигляді співвідношень оптичних густин (ОГ) проб до видко утворився згусток (фібриноген, що є граничного значення (ГЗ). Зразки, для яких співвідношення, може стати джерелом хибно-позитивної ОГ/ГЗ перевищує 1,0 – позитивні. Крім результатів ІФА-системах). Після інкубації «відводять» згусток таблиці подано (з паспортних даних до набору) результати стерильною пастерівською піпеткою та вміст тестування цих проб у комерційних тестах – тесті швидкодіяльнік при температурі 2-8 °С. Проби центр плазменних реактивів (PPR), реакції імунофлуоресценції (ІФА) та імунохімії (ІХІ) можна зберігати в ABS (PIF-абс).

Якщо проби не вдається проаналізувати протягом

Таблиця 4. Вивчення чутливості тест-систем «DIA-SYPH» та «DIA-IgM-SYPH» на панелі сироваток PSS201

Номер панелі зразка	West.-Dick. RPR тип	Wampole RPR тип	Zeus FTA-ABS результат
PSS201-01	8	32	Поз.
PSS201-02	2	8	Поз.
PSS201-03	Нег.	Нег.	Нег.
PSS201-04	Нег.	Нег.	Нег.
PSS201-05*	Нег.	Нег.	Нег.
PSS201-06	16	64	Поз.
PSS201-07	1	2	Поз.
PSS201-08	4	8	Поз.
PSS201-09	1	4	Поз.
PSS201-10	4	16	Поз.
PSS201-11	1	4	Поз.
PSS201-12	Нег.	Нег.	Поз.

К	11,3	13,5	PSS201-22	Нег.	Нег.
			PSS201-23	15,4	2
			PSS201-24	1	4
			PSS201-25	8	128

Оцінку міжсерійного коефіцієнту варіації проводили також з використанням сироваток, вказаних у таблиці 6, на чотирьох серіях тест-систем «DIA-Tгер» та чотирьох серіях «DIA-SYPH». При цьому для тест-набору «DIA-Tгер» цей показник складає 7-14 %, а для тест-системи «DIA-SYPH» – 5-12 %.

У тест-системах «DIA-SYPH» та «DIA-Tгер» позитивні зразки набору PSS201 виявлялися як позитивні «DIA-IgM-SYPH» визначалися як позитивні зразків, що відповідає паспортним даним цього сироваток не містили антитілі класу IgM).

### Вимоги та рекомендації при проведенні досліджень методом ІФА

Коректної постановки аналізу досягають при неухиальному проведенні перерахованих далі умов та вимог.

Якісна підготовка посуду

Посуд має добре митися з використанням рідких засобів для миття, які не містять біодобавок, та ретельно ополіскуватись проточною, а потім дистильованою водою. Посуд, використований для розчину ОФД, не можна мити, застосовуючи засоби для миття. Такий посуд слід щоразу ополіскувати 70 %-ним розчином етилового спирту, а потім дистильованою водою. Варто виділити окремий посуд для роботи з розчинами ОФД, щоб уникнути кон'югатів.

Вивчення специфічності тест-систем для сироваток набору «DIA-Tгер», «DIA-SYPH» та «DIA-IgM-SYPH» проводили, використовувши 2043 неселективних зразки донорської крові, а також зразки сироваток крові, представлено результати вивчення специфічності тест-систем «DIA-Tгер», «DIA-SYPH» та «DIA-IgM-SYPH».

Таблиця 5. Вивчення специфічності тест-систем «DIA-Tгер», «DIA-SYPH» та «DIA-IgM-SYPH»

Вивчена група	Кількість зразків	«DIA-IgM-SYPH»
Донори крові	2043	9

відтворюваність. Величини, що характеризують позитивні (К<sup>+</sup>) та негативні (К<sup>-</sup>) контроли відтворюваності – стандартне відхилення та коефіцієнт варіації цих досліджень представлено в таблиці вираховують після дослідження наборів позитивних сироваток.

Стандартне, чи середньо-квадратичне відхилення в межах планшета та поміж планшетами визначають за формулою:

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

де d – різниця між окремими показниками оптичної щільності та середньою арифметичною величиною ( $X_i - X_{cp}$ ); n – кількість досліджених сироваток;  $X_i$  – оптична густина досліджуваного зразка сироватки;  $X_{cp}$  – середнє арифметичне оптичної густини всіх досліджених зразків.

При дослідженні сироваток показник стандартного відхилення дає узагальнену характеристику відхилень усіх варіантів ОГ для даного діагностикуму. Тому при порівнюванні показників різних тест-систем для визначення відхилень всередині серії та поміж різними серіями рекомендується користуватися коефіцієнтом варіації (CV), що являє собою відношення стандартного відхилення до середнього значення виражене в процентах.

Коефіцієнт варіації (CV) вираховують за формулою:

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

Високий показник CV свідчить про велику варіабельність оптичної густини при роботі з даною тест-системою. Крім того досліджують показники негативних та позитивних контролів. При цьому коефіцієнт варіації стандартних відхилень від середнього значення позитивних та негативних контролів не

Таблиця 6. Вивчення коефіцієнту в тест-систем «DIA-Тер» та «DIA-SY

Характеристика оптичної щільності	«DIA-Тер»	
	CVп, %	CVм, %
1	5,7	7,8
	5,8	7,9
1	4,9	8,4
	6,1	8,2
3	1,6	2,3
1	6,8	8,9
	0,9	1,7