

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель министра здравоохранения

Главный государственный

санитарный врач

_____ М.И. Римжа

10 января 2007 г.

Регистрационный № 135–1106

**МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Республиканский научно-практический центр гигиены

Авторы: д-р мед. наук, проф. С.В. Федорович, Л.Ф.Яковлева

Инструкция предназначена для выявления маркеров туберкулезной инфекции методом иммуноферментного анализа.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Проведение сероэпидемиологического скрининга на туберкулез при проведении профилактических медицинских осмотров для формирования групп с высоким риском развития туберкулеза.

2. Выявление лиц с серологическими маркерами латентно протекающей туберкулезной инфекцией для углубленного исследования.

3. Определение уровня инфицированности лиц с профессиональными заболеваниями органов дыхания (пневмокониозы, хронический пылевой бронхит, бронхиальная астма и др.).

4. Выявление реактивации туберкулезной инфекции у лиц с пневмокониозами, осложненными туберкулезом легких.

5. Дифференциальная диагностика инфекционных осложнений у лиц с бронхолегочной патологией.

6. Выявление активности туберкулезного процесса при различных видах пневмокониозов.

Тест не чувствителен к БЦЖ-вакцинации.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Профпатология, пульмонология, фтизиатрия, клиническая лабораторная практика.

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод иммуноферментного анализа используется с целью выявления групп лиц с подозрением на наличие специфических инфекционных осложнений. Метод ИФА применяется независимо от возраста и от сроков проведения предыдущих исследований. Система диагностических мероприятий включает следующие этапы:

Первый этап – при проведении ежегодных профилактических медицинских осмотров рабочих промышленных предприятий, а также в период между плановыми рентгенологическими осмотрами.

Второй этап – иммунологическое обследование группы лиц с положительной реакцией в ИФА проводится в условиях медико-санитарных частей предприятий, стационара и поликлиник. При наличии специфических противотуберкулезных антител в диагностическом титре повторное расширенное (через 30 дней) иммунодиагностическое обследование лиц с первично положительным ответом ИФА.

Стойко серопозитивные лица, выявленные на втором этапе, и больные пневмокониозами, согласно диагностическому алгоритму, направляются в противотуберкулезный диспансер для углубленного исследования органов дыхания и выявления туберкулеза.

Третий этап – это расширенное клинико-лабораторное обследование стойко серопозитивных лиц на выявление туберкулезной инфекции с помощью различных диагностических методов (рентгенологического, бактериоскопического, туберкулиндиагностики, бронхоскопии, исследования функции внешнего дыхания, ПЦР) в противотуберкулезных учреждениях. Формирование групп риска по туберкулезу и их динамическое наблюдение.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Набор реагентов для ИФА:

- планшеты для иммуноферментного анализа с сорбированным антигеном микобактерий туберкулеза (МБТ);
- контрольный положительный препарат с антителами к антигенам микобактерий туберкулеза (K+), 0.1мл в ампуле № 2;
- контрольная отрицательная сыворотка крови человека (K-) 0,2 мл в ампуле № 3;

- рабочий буферный раствор (концентрат фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с детергентом - 20 мл во флаконе № 4;
- конъюгат - 1 мл во флаконе № 5; субстратный буферный раствор (СБР), 12 мл во флаконе № 6;
- ортофенилендиамин (ОФД) - по 8 мг в пакете № 71;
- гидроперит - таблетка белого цвета во флаконе или упаковке № 8;
- инструкция по применению (1 экз.).

Оборудование:

- спектрофотометр;
- фотометрический анализатор со светофильтром 405-492 нм; приборы для промывания и встряхивания (автоматический промыватель, шейкер);
- дозаторы (одно- и 8-канальные на 5-1000 мкл).

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИФА

Материалом для исследования является сыворотка периферической или венозной крови в количестве 100-200 мкл. Сыворотка может храниться до 6 месяцев при -20 °С и использоваться при условии размораживания не более 2-х раз.

Методика выполнения исследования указывается в прилагаемой инструкции к набору реагентов для ИФА.

Для повышения достоверности результатов целесообразно каждую пробу исследовать в 2 лунках. В лунки С:5, С:6 вносят по 0.1 мл К-, в лунки С:7, С:8 - по 0.1 мл К+, в остальные по 0,1 мл рабочего разведения исследуемых биологических жидкостей, предварительно зафиксировав их расположение. Планшеты закрывают крышками и инкубируют 90 мин при 37 °С, или 60 мин на шейкере. После инкубации содержимое лунок удаляют энергичным встряхиванием и четырехкратным промыванием рабочим раствором ФСБ, внося его 0,2 мл в каждую лунку, выдерживая раствор в лунках 1 мин.

В промытые лунки добавляют по 0,1 мл приготовленного раствора конъюгата в рабочем разведении. Планшеты закрывают крышками и инкубируют 60

мин при 37 °С. Конъюгат удаляют встряхиванием панели, промывают четырехкратно лунки раствором ФСБ. В лунки вносят по ОД мл свежеприготовленной субстратной смеси, планшеты выдерживают в темноте 1-10 мин при 20 °С до появления заметного окрашивания положительного контроля. После чего реакцию останавливают добавлением в каждую лунку по 0,1 мл 33 % серной кислоты. Определяют оптическую плотность в исследуемых лунках при длине волны 492 нм.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценку результатов проводят визуально или спектрофотометрически по показателю оптической плотности (ОП) в исследуемых лунках при длине волны 492 нм и настройки прибора на "0" по пустому планшету.

При визуальной оценке, положительной считается проба, дающая заметно более интенсивное окрашивание в сравнении с отрицательным контролем.

При учете реакции на спектрофотометре ОП в лунках с контроль «+» должна быть не менее чем в 1,6 раза больше, чем с контролем «-».

Положительной считают пробу, показатели ОП которой превышают средний показатель ОП К- на половину разницы между ОП К+ и ОП К-.

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

Компоненты диагностических наборов не представляют угрозы заражения медперсонала. Работа с исследуемым материалом должна проводиться как с потенциально инфицированным. Использованный материал при исследовании крови необходимо обрабатывать дезинфектантом широкого спектра действия не менее 3 часов.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА необходимо трактовать с учетом всех данных обследования пациентов. Стойко серопозитивные лица относятся к группам с высоким риском развития туберкулезной инфекции.

При проведении серологического скрининга исследуются два образца сыворотки крови с интервалом 3-4 недели.

В случае положительной первичной реакции через 3-4 недели исследуется второй образец сыворотки для выявления нарастания титра антител к антигенам МБТ. Положительный результат означает, что в исследуемом материале присутствуют антитела, свидетельствующие об иммунном ответе у пациента на антигены возбудителя туберкулеза. Отрицательный результат свидетельствует об отсутствии антител или их незначительной концентрации в исследуемом материале.

В случае первично положительной реакции проводят повторно ИФА пробы крови через 3-5 недель для выявления стойкой серопозитивности или нарастания титра антител.

При отрицательном ответе по серологическим реакциям дальнейшее наблюдение за обследуемым прекращают.

Лица, у которых повторно выявляются противотуберкулезные антитела, учитываются как стойко серопозитивные и относятся к группе с высоким риском развития туберкулеза.

Расширенное клиничко-лабораторное обследование стойко серопозитивных лиц проводится с помощью различных диагностических методов (флюорографического, рентгенологического, при необходимости компьютерной томографии, бактериологического, иммунологического, бронхоскопии, исследовании функции внешнего дыхания и т. д.) с обязательным включением консультаций фтизиатров - специалистов по легочному и внелегочному туберкулезу.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

Противопоказаний для обследования методом ИФА нет.