

ИММУНОЛОГИЯ

© МАРДАНЛЫ С.Г., 2019

Марданлы С.Г.

К ВОПРОСУ О СТАНДАРТИЗАЦИИ УСЛОВИЙ ПРОИЗВОДСТВА КОМПОНЕНТОВ И ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ НА ПРИМЕРЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

¹ЗАО «ЭКОлаб, 142530, г. Электрогорск, Московская обл., Россия;

²Государственный гуманитарно-технологический университет «ГГТУ» ГОУВО Московской области, 142611, г. Орехово-Зуево, Россия

Использование в ряде клинико-диагностических лабораторий (КДЛ) технологии подготовки компонентов для реакции иммунофлюоресценции (РИФ) в соответствии с рекомендациями Методических указаний, введенных приказом Минздрава РФ от 26 марта 2001 г. № 87, не гарантирует необходимой стандартности условий подготовки и проведения РИФ. Последнее достигается использованием в практике работы КДЛ соответствующих наборов реагентов промышленного производства.

Ключевые слова: диагностика сифилиса; реакция иммунофлюоресценции; антиген *Treponema pallidum*.

Для цитирования: Марданлы С.Г. К вопросу о стандартизации условий производства компонентов и постановки реакции иммунофлюоресценции на примере лабораторной диагностики сифилиса (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (7): 409-412. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-409-412>

MARDANLY S.G.

STANDARDIZATION OF COMPONENT MANUFACTURING CONDITIONS AND SETTING UP THE IMMUNOFLUORESCENCE REACTION ON THE EXAMPLE OF SYPHILIS LABORATORY DIAGNOSTICS

¹CJSC EKOLab, 142530, Moscow region, Elektrogorsk city, Russia;

²State Educational Institution of Higher Education of the Moscow Region. State University of Humanities and Technology, 142611, Moscow region, Orekhovo-Zuevo, Russia

The use of technology for preparing components for immunofluorescence reaction (RIF) in a number of clinical diagnostic laboratories (CDL) in accordance with the recommendations of the Guidelines introduced by order of the RF Ministry of Health No 87 dated March 26, 2001 does not guarantee the required standardization of RIF preparation and conduct conditions. The latter is achieved by using the appropriate industrial production reagent kits in the CDL practice.

Key words: syphilis diagnostics; immunofluorescence reaction; *Treponema pallidum* antigen.

For citation: Mardanly S.G. Standardization of component manufacturing conditions and setting up the immunofluorescence reaction on the example of syphilis laboratory diagnostics (literature review). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (7):409-412 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-409-412>

For correspondence: Mardanly S.G., Doctor of Medical Sciences, R&D Director in CJSC EKOLab, Professor at the Department of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences, State University of Humanities and Technology (Orekhovo-Zuevo); e-mail: ekolab-president@mail.ru

Conflict of interests. The author declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 17.06.2019
Accepted 04.07.2019

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) входит в число методов лабораторной диагностики, рекомендуемых для практического использования приказом МЗ РФ от 26 марта 2001 года № 87 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса»¹.

¹Приказ МЗ РФ от 26 марта 2001 г. № 87 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса».

Для корреспонденции: Марданлы Сейфадин Гашимович, д-р мед. наук, дир. ЗАО «ЭКОлаб» по науке, проф. каф. фармакологии и фармацевтических дисциплин «ГГТУ»; e-mail: ekolab-president@mail.ru

Этим приказом введены в действие Методические указания «Постановка отборочных и диагностических тестов на сифилис», в которых среди прочих методик детально описана методика подготовки и постановки РИФ, которой может воспользоваться любая клиническая лаборатория, располагающая необходимыми материально-техническими возможностями. В настоящее время при диагностике сифилиса многие лаборатории, располагающие такими возможностями, ориентируются именно на эту методику, предпочитая самостоятельно готовить все необходимые для постановки РИФ компоненты, хотя на рынке медицинских изделий для *in*

vitro-диагностики уже не один год представлены отечественные наборы реагентов для указанных исследований (см, например, «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG» производства ЗАО «ЭКОлаб», РУ № РЗН 2013/247 или «ЛюмиБест антипаллидум, комплекты 1 и 2» производства АО «Вектор-Бест», РУ № ФСР 2012/13695).

Целесообразно сопоставить технологичность обоих вариантов решения задачи обследования пациентов на сифилис с помощью РИФ.

Методика постановки РИФ и учёта её результатов в этих вариантах, т.е. с использованием, как компонентов собственного изготовления, так и коммерческого набора идентична. На препарат, содержащий *Treponema pallidum*, наносится исследуемая сыворотка, предварительно обработанная сорбентом неспецифических антител, после соответствующей экспозиции, промывания фосфатным буферным раствором и подсушивания на препарат наносится меченная люминофором сыворотка животных, иммунизированных сывороточным белком человека, и после очередной экспозиции, промывания и подсушивания препарата регистрируются результаты реакции. Препарат просматривается под люминесцентным микроскопом и регистрируется наличие и интенсивность флюоресценции *Treponema pallidum*.

Принципиальных отличий в технологии постановки РИФ здесь нет, и быть не может, поскольку любой набор реагентов, предназначенный диагностики сифилиса с помощью РИФ, должен обеспечивать воспроизведение указанной методики постановки и учёта реакции.

Совершенно иная картина при сопоставлении технологии подготовки к проведению исследования.

Следует отметить значительные различия в необходимом материально-техническом обеспечении.

Согласно приказу № 87 в материально-техническом обеспечении РИФ названы только люминесцентный микроскоп с ртутно-кварцевой лампой ДРШ-250, термостат и инактиватор, реальные потребности лаборатории, в которой самостоятельно готовится всё необходимое для постановки РИФ, значительно шире.

В их число, помимо стандартного оборудования клинических лабораторий, в которых исследуются образцы крови (сыворотки), необходимо включить:

1. Оборудование бактериологической лаборатории, позволяющее работать с живыми *Treponema pallidum* (т.е. с микроорганизмами 3 группы патогенности) и материалами, инфицированными ими.

2. Виварий для содержания интактных и заражённых *Treponema pallidum* кроликов.

В соответствии с приказом № 87, в лаборатории готовится антиген – взвесь патогенных *Treponema pallidum* штамма Никольса из 7-9-суточного орхита кролика, которая хранится до использования при 4° С 2-4 мес. Кроме антигена, указаны такие необходимые для постановки РИФ компоненты, как сорбент (разрушенная ультразвуком взвесь смеси культуральных *Treponema pallidum* штаммов V, VII, VIII, IX и Рейтера для удаления из исследуемого образца неспецифических антител) и антивидовая люминесцирующая сыворотка (меченая флюорохромом сыворотка крови животных, иммунизированных сывороточным белком человека), контроли – резкоположительный контроль, слабоположительный контроль и неспецифический контроль; поскольку методика их приготовления в документе не описана, могут, очевидно, использоваться соответствующие коммерческие препараты.

Подготовка к исследованию, включает инактивацию исследуемых образцов (30 мин при 56° С), если кровь берётся непосредственно перед исследованием, обязательное титрование каждой новой серии сорбента и люминесцирующей сыворотки для определения их разведений, обеспечивающих максимальную чувствительность и специфичность реакции.

Непосредственно перед постановкой из антигена готовят препараты-мазки на тонких, хорошо обезжиренных предметных стеклах, на обратной стороне которых стеклорезом обозначены кружки диаметром 0,7 см (по 10 кружков на 1 предметном стекле). В пределах каждого кружка на стекло наносят антиген, распределяя его в пределах каждого кружка запаянным концом пастеровской пипетки, высушивают стекла на воздухе и фиксируют препараты 10 мин в химически чистом ацетоне.

При использовании готовых (коммерческих) наборов реагентов для РИФ не требуется ни бактериологическая лаборатория, ни виварий. В набор входят стекла с уже готовыми препаратами-мазками, приготовленными из стандартизованной взвеси *Treponema pallidum*, предварительно оттитрованные сорбент неспецифических антител и люминесцирующая сыворотка, т.е. при этом не нужны все указанные выше подготовительные операции.

С этой точки зрения, использование готовых наборов, т.е. второго варианта решения задачи и технологичней и экономически целесообразней.

Преимущества этим не исчерпываются.

В соответствии с приказом № 87 результат РИФ (интенсивность флюоресценции *Treponema pallidum*) учитывают по 5-балльной системе: «-», «+», «2+», «3+», «4+», т.е., используя ранговый (или, как сейчас принято его именовать, полуколичественный) показатель. То, что его значение отражает концентрацию антител в образце, общепризнано, но столь же общепризнана значительная вариабельность результатов, прямо связанная с условиями постановки реакции и учёта её результатов. Интенсивность флюоресценции принято считать ориентировочной оценкой содержания антител. По нашему мнению, эта «ориентировочность» связана исключительно с нестандартностью условий постановки РИФ и бесприборной («на глаз») оценкой результатов. Специальные исследования корреляции показателей интенсивности свечения с содержанием специфических антител, выполненные при разработке соответствующей тест-системы для диагностики токсоплазмоза, показали, что минимизация влияния случайных факторов на результат РИФ за счёт использования средних по группам исследованных образцов показателей интенсивности свечения *Toxoplasma gondii* обеспечивает коэффициент их корреляции с содержанием специфических антител по данным ИФА, равный 0,94, т.е. почти функциональную связь этих показателей [2].

Исходя из алгоритма подготовки к РИФ, в вариабельность её результатов основной вклад вносит вариабельность её компонентов, прежде всего, трепонемного антигена, т.е. препаратов-мазков, приготовленных из суспензии *Treponema pallidum*.

Приготовление антигена непосредственно в лабораториях – неизбежная внутрисерийная, межсерийная²

²Внутрисерийная вариация есть следствие неодномоментного использования одной и той же серии суспензии *Treponema pallidum* для изготовления препаратов-мазков, а неизбежность межсерийной вариации следует из срока годности суспензии *Treponema pallidum* – 2-4 мес.

и межлабораторная вариация качества этого реагента. При использовании несколькими лабораториями одной и той же серии набора реагентов промышленного изготовления речь может идти о вариации только между препаратами-мазками, приготовленными в одном технологическом цикле, которая всегда будет меньше внутри-серийной вариации препаратов-мазков, приготовленных в лаборатории в нескольких технологических циклах.

Есть очевидные различия и в технологиях приготовления антигена *Treponema pallidum*, рекомендованной приказом № 87, и используемой в промышленном производстве этого реагента (табл. 1).

Несложно убедиться, что стандартность основного специфического компонента РИФ при его промышленном производстве неизбежно должна быть выше стандартности этого реагента при изготовлении непосред-

ственно в лаборатории. Если учесть, что в последнем случае и все прочие специфические компоненты реакции, как коммерческие, так и лабораторного приготовления, предварительно титруются с использованием антигена, их стандартность всегда будет ниже стандартности тех же компонентов, входящих в любую серию наборов промышленного изготовления.

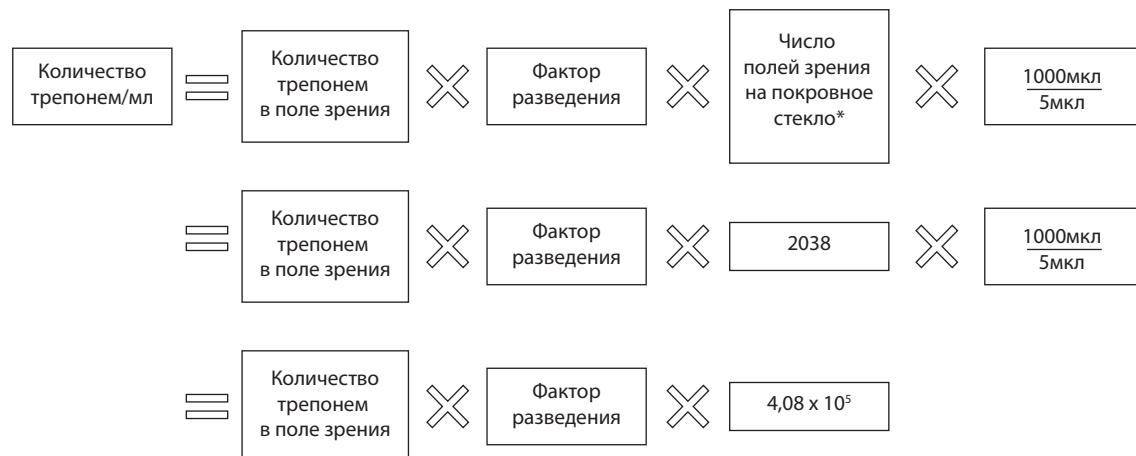
Способом существенного повышения диагностической эффективности РИФ как метода исследования может быть переход на использование в практической деятельности всех КЛД только готовых наборов реагентов.

Кроме вариабельности компонентов реакции «ориентировочность» результатов РИФ обусловлена способом их учёта, т.е. оценкой интенсивности свечения *Treponema pallidum* (в случае диагностики сифилиса) в поле зрения микроскопа «на глаз». Путём превращения иммунофлюо-

Таблица 1.

Технологии приготовления антигена *Treponema pallidum*

Технология, рекомендованная Методическими указаниями Минздрава РФ приказом № 87	Технология, используемая при производстве «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG» (ЗАО «ЭКОлаб»)
Через 7-9 сут после заражения кроликов в асептических условиях выделяют яички, разрезают их на 10-14 частей, заливают каждое 5 мл среды ЦКВИ или изотонического раствора хлорида натрия, каплю полученной взвеси наносят пастеровской пипеткой на предметное стекло и исследуют в микроскопе с конденсором тёмного поля на наличие <i>Treponema pallidum</i> . При их наличии взвесь переносят во флакон с 50 мл среды ЦКВИ или изотонического раствора хлорида натрия и встряхивают на шейкере, время встряхивания зависит от числа трепонем, обнаруженных при микроскопии – при наличии 5-10 трепонем в поле зрения встряхивание длится 1 ч при наличии 30-40 – 20-30 мин. После встряхивания содержимое флакона центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин, в надсадочной жидкости с помощью тёмнопольной микроскопии определяют концентрацию трепонем. Для приготовления препаратов антигена (препаратов-мазков) для постановки РИФ необходима взвесь, содержащая 40-60 трепонем в поле зрения микроскопа. Перед каждой постановкой необходимо определять наличие во взвеси спонтанной агглютинации трепонем и их количество.	Через 7-10 сут. после заражения кроликов в асептических условиях выделяют яички. Каждое выделенное яичко измельчают ножницами до кашицеобразного состояния, заливают 5 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия, встряхивают на орбитальной шейкере 25 мин при 250 об/мин, полученную взвесь центрифугируют по 5 мин при 1000 об/мин, сливают надсадочную жидкость и выполняют эту процедуру ещё 2 раза, в полученном центрифугате (взвесь <i>Treponema pallidum</i>) контролируют степень очистки от фрагментов клеток яичка, при необходимости проводят дополнительное центрифугирование в тех же условиях, вновь контролируют чистоту суспензии и при необходимости центрифугируют её 5-6 мин при 1250 об/мин. Очищенную взвесь центрифугируют 30 мин. при 8000 об/мин для осаждения трепонем, сливают центрифугат и ресуспендируют осадок в фосфатном буферном растворе в объёме в 2-3 раза меньшем исходного объёма взвеси трепонем. В полученной суспензии (антиген <i>Treponema pallidum</i>) определяется концентрация трепонем, для чего готовят 1,000 мл взвеси, разведённой изотоническим раствором хлорида натрия 1:100 (10 мкл взвеси + 990 мкл изотонического раствора хлорида натрия), 5 мкл этого разведения наносят на предметное стекло, накрывают покровным стеклом (18x18 мм) и с помощью тёмнопольной микроскопии определяют состояние трепонем (в поле зрения должны наблюдаться хорошо подвижные, с ненарушенной морфологией <i>Treponema pallidum</i>) и их содержание во взвеси – подсчёт их числа в поле зрения (среднее по 10 полям зрения) и пересчёт на 1 мл, исходя из известной площади поля зрения, известной площади покровного стекла и известного объёма жидкости, находящегося под покровным стеклом (рис. 1)



* число полей зрения = площадь покровного стекла, мм²/площадь поля зрения, мм²

Рис. 1. Формула для подсчета количества *Treponema pallidum* в 1 мл.

ресцентного метода диагностики в современный способ диагностического исследования является автоматизация регистрации и учёта результатов РИФ с использованием средств видеодиффракционной регистрации (ВЦР) с последующим компьютерным анализом полученных данных. Такое оборудование существует, но только в импортном варианте [3], хотя до недавнего времени существовала надежда на успешное решение этой задачи коллективом специалистов под руководством Ю. Ю. Венгерова, т.е. на появление соответствующей отечественной системы. Смерть руководителя привела к распаду коллектива, так что остается только надеяться, что научное руководство Института биохимии им. А. Н. Баха РАН всё же не даст окончательно заглухнуть этому крайне перспективному направлению, позволяющему объективизировать и автоматизировать регистрацию и учёт результатов практически любых серологических исследований, основным недостатком которых как раз и является субъективность оценок соответствующих реакций.

Проведённый сравнительный анализ технологичности двух вариантов организации лабораторного исследования на сифилис с использованием РИФ позволяет сделать заключение о преимуществах использования в КЛД соответствующих коммерческих тест-систем и о целесообразности отказа от приготовления основных компонентов, необходимых для этого исследования, в лабораторных условиях. Нужны лишь определённые административные решения на уровне Минздрава РФ. Для превращения иммунофлюоресцентного анализа в современный метод исследования явно не хватает завер-

шения работ по внедрению метода ВЦР и в этой области серодиагностики. Для завершения нужны не только благие пожелания, но и вполне конкретные решения о включении соответствующих разработок в общую программу создания производств отечественной аналитической техники для нужд клинической лабораторной диагностики.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Марданлы С.Г. Эпидемиологический надзор за инфекциями TORCH-группы на основе современных технологий лабораторной диагностики. Дисс. д-ра мед.наук. Москва; 2016.
2. Computer-Supported Immunofluorescence Microscope by EUROIMMUN with Basler ace and Basler dart Cameras, <https://www.baslerweb.com/en/>.

REFERENCES

1. Mardany S.G. Epidemiological surveillance of TORCH infections based on modern laboratory diagnostic technologies. Diss. ... Moscow; 2016. (in Russian)
2. Computer-Supported Immunofluorescence Microscope by EUROIMMUN with Basler ace and Basler dart Cameras, <https://www.baslerweb.com/en/>.

Поступила 17.06.19

Принята к печати 04.07.19