Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра кардиологии, функциональной и клинико-лабораторной диагностики ИПО

**РЕФЕРАТ**

Стандартизованная аналитическая технология: «Определение определения антител класса G к специфическим белкам T.pallidum ( ИФА качественный, полуколичествены)».

 **Выполнила:** врач-ординатор
 Сайферт А.В.

Красноярск, 2021г

1. **Цель исследования:**

Сифилис – это хроническое инфекционное заболевание, в развитии которого выделяют несколько четко определяемых стадий - первичный, вторичный, третичный и четвертичный сифилис. Эти стадии сопровождаются различными клиническими симптомами, типичными из которых являются

первоначально возникающая кожная язва (шанкр), за которым следует длительный латентный период без каких-либо видимых клинических проявлений, затем развивается сифилитическая сыпь. При отсутствии лечения в конечном счете могут развиваться поражения сердечно-сосудистой системы и нейросифилис.

Возбудителем данной инфекции является спирохета Treponema pallidum. Заражение обычно происходит при половом контакте, однако болезнь может передаваться при переливании инфицированной крови.

Кроме того, возможно развитие внутриутробной инфекции. Было установлено, что данный микроорганизм практически невозможно выращивать на искусственных питательных средах, и диагностика этой инфекции обычно основана на определении антител в крови, появляющихся вскоре после первоначального заражения.

**2.** **Требования к обеспечению выполнения технологии**

**2.1 Требования к специалистам и вспомогательному персоналу**

Перечень специалистов с высшим и средним образованием, участвующих в выполнении данной технологии:

- врач клинической лабораторной диагностики или биолог;

- специалист со средним медицинским образованием (медицинский технолог, медицинский лабораторный техник, фельдшер-лаборант, лаборант).

Требования к образованию специалистов:

Врачи клинической лабораторной диагностики или биологи должны иметь последипломное образование и периодически проходить повышение квалификации в установленном порядке. Врачи должны иметь сертификат специалиста. Специалисты со средним образованием (медицинский технолог, медицинский лабораторный техник, фельдшер-лаборант, лаборант) должны иметь соответствующую квалификацию по диплому, сертификат специалиста и проходить в установленном порядке повышение квалификации.

Требования к знаниям и умениям специалистов, выполняющих данное исследование, соответствуют требованиям образовательных стандартов. (2).

**2.2 Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала**

Требования по безопасности труда при выполнении технологии соответствуют общим правилам безопасности при работе в клинико-диагностической лаборатории согласно ГОСТ Р 52905 – 2007. Должны соблюдаться правила биологической безопасности, правила сбора и удаления отходов, правила работы с электроприборами и реактивами, пожарной безопасности.

Все образцы, содержащие биологический материал являются потенциальными источниками инфекции. Для соблюдения биологической безопасности выполняют следующие правила: распаковка присланного в лабораторию биологического материала проводится в индивидуальных средствах защиты (халаты, резиновые перчатки); после окончания работы проводят дезинфекцию использованных расходных материалов, рабочих мест и помещений лаборатории в резиновых перчатках. Для обеззараживания используются средства, рекомендуемые для дезинфекции.

Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в техническом паспорте к применяемому в технологии ИФА анализатора.

Все реагенты в наборе тест системы предназначены для использования только «in vitro диагностики».

Необходимо использовать одноразовые перчатки при работе с реагентами и образцами и тщательно мыть руки после работы.

Не осуществляйте пипетирование ртом.

С компонентами набора, содержащими человеческую кровь, сыворотку или плазму, следует обращаться, как с потенциально способными передавать инфекцию.

Оборудование и приборы, находившиеся в контакте с образцами или реагентами в том числе и с промывающим буфером, должны рассматриваться как контаминированные и обрабатываться должным образом.

Не допускается проливания образцов или растворов, содержащих образцы.

Пролитый материал необходимо обработать 10% хлорированным раствором. Если пролитая жидкость является кислотой, ее необходимо нейтрализовать содой и вытереть насухо фильтровальной бумагой. Материалы, используемые для дез. обработки, должны быть утилизированы в контейнер для загрязненного материала.

Инструменты и оборудование, а также рабочие поверхности, на которых проводился анализ, необходимо до и после работы протирать раствором с объемной долей этилового спирта 70%, либо другими синтетическими средствами вируцидного действия.

Для предупреждения пожаров необходимо соблюдать правила пожарной безопасности в соответствии с действующими нормативными документами.

 **2.3 Материальные ресурсы, необходимые для выполнения**

Лабораторный стол или процедурный столик.

 Лабораторные стулья или кресла (с поверхностью, подлежащей обработке дезинфицирующими средствами).

 Бытовой холодильник для хранения биологического материала, поступившего для исследования с камерой охлаждения до +4-8 °С и морозильной камерой на минус 18-24 °С.

 Низкотемпературная морозильная камера на минус 18-24 °С.

 Сумки-холодильники с комплектом хладагентов (аккумуляторов холода) для транспортировки биологических материалов.

 Герметичные емкости для транспортировки биологических материалов (различного объема) без термоизоляции (с возможностью их опломбирования).

 Центрифуга лабораторная настольная обеспечивающая скорость вращения от 1 до 3 тыс. об./мин, оснащенная кареткой для размещения 10-12 пробирок, и регулятором времени (таймером);

 Источник направленного света (медицинский торшер или лампа-прищепка).

 Медицинские перчатки.

 Пробирки пластиковые одноразовые с крышками типа эппендорф объемом 1,0-1,5 мл.

 Штативы пластиковые или металлические для размещения пробирок с образцами биологического материала.

 Контейнер для транспортировки биологического материала.

 Стерильные салфетки или марлевые тампоны.

 Бинт нестерильный 5×7.

 Набор пипеточных дозаторов с переменным объемом 0,05-0,5; 0,1-1,0 мл; например: «Колор»фирмы «Ленпипет» (Санкт-Петербург, Россия); «Biohit» фирмы «Biohit» (Санкт-Петербург,Россия); «Transferpette» фирмы «BRAND GMBH+CO KG».

 Стерильные пластиковые наконечники для пипеточного дозатора объемом от 0,05 до 1,0 мл.

 Раствор натрия хлорида изотонического, 0,9% (стерильный в ампулах по 5,0 мл).

 Автоматический промыватель (вошер) иммуноферментных планшетов.

Инкубатор микропланшетный или термостатируемый шейкер ( 37,0С)

Градуированные цилиндры: 25мл, 100мл. 1000мл

Автоматический анализатор для иммуноферментного анализа открытого типа

Бумага фильтровальная

Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерить оптическую плотность раствора в лунках планшета при длинах волн 450нм и 620-680нм.

 Персональный компьютер базовой комплектации (системный блок, монитор, клавиатура, мышь),имеющий необходимое специальное и общесистемное программное обеспечение.

 Принтер для распечатки результатов исследования.

 Настольный калькулятор.

 Контейнер для дезинфицирующей обработки использованных расходных материалов.

 Пластиковые мешки для сбора отработанного биологического материала с целью последующей

дезинфекционной обработки и дальнейшей утилизации.

 Аквадистиллятор электрический ДЭ-10-СПб, № 98/219-335.

 Посуда медицинская лабораторная мерная и принадлежности для клинико-лабораторных

исследований

 Лабораторные часы.

 Аптечка «АНТИСПИД» (неотложной медицинской помощи в лаборатории) с набором медикаментов, стерильной воды, дезинфицирующих растворов и перевязочного материала в пределах сроков их годности.

 Канцелярские принадлежности.

 Журналы для регистрации биологического материала.

 Облучатель ультрафиолетовый.

Сертифицированные тест системы для выполнения иммуноферментного анализа (Определение определения антител класса G к специфическим белкам T.pallidum ( ИФА качественный, полуколичествены)».

 Характеристика выполнения ИФА определение антител к Определение определения антител класса G к специфическим белкам T.pallidum

 этапы:

а) доставка, прием и регистрация биологического материала;

б) приготовление аналитических проб из доставленных образцов (если этого требует технология исследования);

в) подготовка рабочих реагентов

г) Проведение анализа ИФА согласно инструкции к тест ситеме

д) оценка результатов;

е) оценка правильности исследования (контроль качества исследования);

ж) регистрация заключений.

**3. Характеристика методик выполнения технологии**

**3.1. Взятие образцов биологического материала**

На точность и правильность результатов оказывает влияние техника взятия крови, используемые при этом инструменты (иглы и др.), а также пробирки, в которые берется, а в последующем хранится и транспортируется кровь.

Кровь для берут у пациента из вены. Кровь следует брать натощак (после примерно 12 часов голодания, воздержания от приема алкоголя и курения), между 7 и 9 часами утра, при минимальной физической активности непосредственно перед взятием (в течение 20-30 мин), в положении пациента лежа или сидя. Взятие материала следует проводить в резиновых перчатках, соблюдая правила асептики.

Подготовка пациента к взятию крови из вены включает несколько этапов.

Место венепункции нужно продезинфицировать марлевой салфеткой или специальной безворсовой салфеткой, смоченной 70% спиртом и подождать до полного высыхания антисептика (30-60 секунд). Применение ватных тампонов и других волокнистых материалов подобного рода может повлиять на и воспроизводимость измерения. Не рекомендуется использовать 96о спирт, так как он дубит кожу, поры кожи закрываются, и стерилизация может быть неполной.

Не рекомендуется вытирать и обдувать место прокола, пальпировать вену после обработки. Рука пациента должна покоиться на твердой поверхности, быть вытянута и наклонена немного вниз так, чтобы плечо и предплечье образовывали прямую линию. Необходимо следить, чтобы в момент взятия крови кулак пациента был разжат. Жгут следует накладывать не более чем на 1-2 минуты. Игла должна быть достаточно большого диаметра и иметь короткий срез, чтобы не травмировать противоположную стенку вены во избежание тромбоза. После взятия крови необходимо приложить сухую стерильную салфетку к месту венепункции, а затем наложить давящую повязку на руку или бактерицидный пластырь.

П р и м е ч а н и е ─ Взятие крови шприцом с последующим переливанием в пробирку нежелательно из-за формирования микросгустков и гемолиза.

Рекомендуется применение вакуумных пробирок для взятия венозной крови. Под влиянием вакуума кровь из вены быстро поступает в пробирку, что упрощает процедуру взятия и сокращает время наложения жгута.

Вакуумная система состоит из трех основных элементов, соединяющихся между собой в процессе взятия крови: стерильной одноразовой пробирки с крышкой и дозированным содержанием вакуума, стерильной одноразовой двусторонней иглы, закрытой с обеих сторон защитными колпачками, и одно- или многоразового иглодержателя. Пробирки, входящие в закрытую вакуумную систему, содержат различные добавки и активаторы свертывания.

Кровь для ИФА на сифилис берут в вакуум систему с ЭДТА (Исключения: Забор крови для исследования крови на Syphilis RPR, Syphilis TPHA, Syphilis TPHA (полуколичественный анализ) производится только в “сухую” пробирку или специальную вакуумную систему без антикоагулянта).

Кровь должна быть доставлена в лабораторию в день забора. Пробирку с кровью до исследования хранят в холодильнике при +4°С - +8°С.

Максимальный срок хранения сыворотки при температуре +4°С - +8°С – 48 часов Максимальный срок хранения сыворотки при температуре -20°С – длительное хранение.

Допускается только однократная разморозка сыворотки.

Метод взятия крови с помощью закрытых вакуумных систем имеет ряд преимуществ, основными из которых являются обеспечение высокого качества пробы и предотвращение любого контакта с кровью пациента, а значит, обеспечение безопасности медицинского персонала и других пациентов за счет существенного снижения риска заражения гемоконтактнымиинфекциями.

Необходимо строго соблюдать объем взятой крови, который должен соответствовать указанной отметке на пробирке. Несоблюдение этого условия, а также недостаточно тщательное перемешивание крови может повлечь за собой появление микросгустков.

Сразу после заполнения пробирки кровью до указанного на ней объема пробу следует осторожно перемешать плавным переворачиванием и вращением пробирки. Пробирки нельзявстряхивать - это может вызвать пенообразование и гемолиз.

**3.2. Идентификация образца**

Сотрудник лаборатории, принимающий материал, должен проверить:

- правильность оформления направления: в бланке–направлении указываются данные обследуемого (фамилия, имя и отчество, возраст, № истории болезни или амбулаторной карты, отделение, диагноз, проведенная терапия);

- маркировку пробирок с образцами (на них должны быть нанесены код или фамилия больного, идентичные коду и фамилии в бланке направления материала для исследования). Лаборант должензарегистрировать доставленный материал, отметить количество пробирок.

**3.3. Приемлемость образца**

Не применяют для исследования гемолизированные сыворотки, образцы с признаками бактериального пророста, так как они могут показывать неспецифические положительные или отрицательные результаты, а также результаты, которые технически трудно учитывать. Решение о браковании образцов сыворотки/плазмы крови и невозможности включения их в исследование принимает врач, ответственный за проведение исследований, он сразу же сообщает об этом регистратору или процедурной медицинской сестре для принятия мер по получению и доставке другого образца от этого пациента.

**3.4. Описание хода выполнения данной стандартизованной технологии**

**Принцип метода.**

На твердофазном носителе (в большинстве тест-систем в качестве носителя используется поверхность лунок полистиролового планшета) фиксируется антиген возбудителя инфекции, антитела к которому необходимо выявить. Антиген, иммобилизованный на поверхности твёрдого носителя, принято называть иммуносорбентом. В ходе инкубации иммуносорбента с испытуемой сывороткой при наличии в ней антител к данному антигену происходит их связывание в комплекс “антиген–антитело”. После удаления несвязавшихся иммуноглобулинов следует инкубация с мечеными ферментом антителами к иммуноглобулинам человека (конъюгатом), в ходе которой на поверхности носителя происходит присоединение к имеющимся комплексам “антиген–антитело” антител, меченых ферментом (в качестве фермента чаще всего используется пероксидаза хрена). После удаления несвязавшегося конъюгата в ходе инкубации с раствором субстрата происходит взаимодействие фермента с субстратом, в результате чего развивается цветная реакция, интенсивность которой зависит от количества связанных сывороточных антител (в случае использования пероксидазного конъюгата в качестве субстрата применяют перекись водорода в сочетании с ортофенилендиамином (ОФД), 5-аминосалициловой кислотой (5-АСК) или тетраметилбензидином (ТМБ)). Результат реакции оценивается спектрофотометрически с выводом цифровых данных, что исключает субъективность оценки.

**Подготовка к исследованию:**

Тест система Anti-Treponema pallidum ELISA (IgG), “EUROIMMUN” для полуколичественного и количественного метода.

 Перед использованием все реагенты необходимо прогреть до комнатной температуры (+18°С - +25 °С) в течение 30 минут. После первого использования реагенты сохраняют стабильность в течение указанного срока годности, если они хранятся при температуре от +2 °С до +8 °С и защищены от микробной контаминации.

Настроить термостатируемую камеру или инкубатор на температуру 37 °С ± 1°С.

Лунки, покрытые антигенами: Готовы к использованию. Вскрыть защитную упаковку планшета, расстегнув имеющуюся на пакете самоуплотняющуюся застежку. Во избежание конденсации влаги внутри лунок, не вскрывайте пакет до тех пор, пока он не нагреется до комнатной температуры. Отломив необходимое количество лунок, остальные неиспользованные лунки необходимо немедленно вложить вновь в ту же защитную упаковку и плотно закрыть ее на застежку (не вынимайте из упаковки пакетик с влагопоглотителем). После первого вскрытия упаковки плотно упакованные вновь лунки с антигенами можно хранить минимум 4 месяца в сухом месте при температуре от +2 °С до +8 °С.

Калибраторы и контроли: Готовы к использованию. Тщательно перемешать перед использованием.

Ферментный конъюгат: Готов к использованию. Тщательно перемешать перед использованием.

Буфер для образцов: Готов к использованию.

Промывочный буфер: Поставляется в виде 10-кратного концентрата. Если образовались кристаллы, их можно растворить перед разведением буфера, нагревая концентрат до 37°С и интенсивно взбалтывая.

Необходимое количество концентрата следует отобрать из бутыли чистой пипеткой и растворить деионизированной или дистиллированной водой (1 часть концентрированного реагента плюс 9 частей воды).

Готовый разведенный промывочный буфер стабилен до 1 месяца, если его хранят при температуре от +2С до +8 С и правильно используют.

Раствор хромогена/субстрата: Готов к использованию. После отбора необходимого количества реагента из флакона необходимо немедленно вновь закрыть его, так как раствор чувствителен к свету. Во время использования раствор хромогена/субстрата должен быть бесцветным. Запрещено используйте раствор, если он приобрел голубую окраску.

Стоп-реагент: Готов к использованию.

Для полуколичественного анализа используют калибратор 2, а также положительный и отрицательный контроли и исследуемые образцы. Положительный и отрицательный контроли выполняют роли внутренних контролей для проверки правильности процедуры тестирования. Их следует использовать при каждой постановке анализа.

**Ход исследования:**

(1-я стадия)

Внесите в отдельные лунки планшета по 100 мкл калибратора № 2, положительного(2 лунки) и отрицательного(3 лунки) контролей и исследуемых образцов. При ручном методе закройте микропланшеты защитной пленкой. При использовании автоматического анализатора следуйте инструкциям производителя в отношении закрытия микропланшета. Инкубируйте планшет в течение 60 минут при 37 °С ± 1°С. Промывка Вручную. Удалите содержимое лунок, затем последовательно промойте все лунки 3 раза, каждый раз внося по 300 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку. Автоматическая. Промойте лунки 3 раза, внося по 450 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку (программирование устройства для промывания планшетов в режиме переполнения: “Overflow Modus”). Оставляйте промывочный буфер в каждой лунке в течение 30 – 60 секунд во время каждого цикла промывки, затем удаляйте содержимое лунок. После промывки (вручную или автоматической) тщательно удаляйте остатки промывочного буфера из лунок, постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.

Примечание. Остатки жидкости (>10 мкл), скапливающейся в лунках после промывки, могут повлиять на субстратную реакцию и привести к получению ложно заниженных значений оптической плотности. Неправильная промывка (например, менее 3 промывочных циклов, слишком маленькие объемы промывочного буфера или слишком короткое время реакции) может привести к ложно завышенным значениям оптической плотности.

(2-я стадия)

Внесите в лунки планшета по 100 мкл ферментного конъюгата (меченных пероксидазой антител к IgG человека). Инкубировать при комнатной температуре (18-25 °С) в течение 30 минут. Промывка: Удалить содержимое лунок. Промыть планшет как описано выше.

 (3-я стадия)

Внесите в лунки планшета по 100 мкл раствора хромоген/субстрат. Инкубировать при комнатной температуре (18-25 °С) в течение 15 минут (предохранять от воздействия прямых солнечных лучей).

Остановка реакции : Внесите в лунки планшета по 100 мкл стоп-реагента в той же последовательности и с той же скоростью, как и раствор хромоген/субстрат.

Измерение:

 Установить прибор на твердую ровную горизонтальную поверхность (стол), при этом на него не должны падать прямые солнечные лучи и в непосредственной близости не должны находиться источники тепла и сильного электромагнитного излучения. Не допускается установка прибора на мягкую поверхность, так как при этом ухудшается доступ воздуха для охлаждения. Вставьте вилку сетевого кабеля в сеть. Включите тумблер на задней панели прибора. С помощью планшетного спектрофотометра измеряют интенсивность окрашивания в лунках при длине волны 450 нм (значение референтной длины волны между 620 нм и 650 нм) в течение 30 минут после добавления стоп- реагента. Перед измерением осторожно встряхнуть планшет для обеспечения равномерного распределения раствора.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТА:

Оценка результатов полуколичественного анализа производится путем расчета соотношения оптической плотности контроля или исследуемого образца и оптической плотности калибратора 2. При вычислениях руководствуются следующей формулой:

EUROIMMUN рекомендует следующую интерпретацию результатов:

Соотношение < 0,8 отрицательный

Соотношение > 0,8 до < 1,1 пограничный

Соотношение > 1,1 положительный

При получении пограничного результата через 7 дней следует взять еще один образец крови данного пациента и провести параллельный анализ первого и второго образцов. Исследование обоих образцов позволяет оценить изменение титра антител, произошедшее за 7 дней.

**4. Регистрация результатов**

Заключения регистрируют на бумажных и электронных носителях, которые хранят в установленном порядке. Бланки с результатами вклеивают в историю болезни, при использовании информационно-вычислительных систем (компьютерной техники) заключения вводят в электронную историю болезни.

Все отказы выполнения исследования также должны регистрироваться (с указанием причины отказа).

регистрация результатов

В бланке ответа должно быть указано:

- название лаборатории и медицинской организации;

- информация о пациенте – ФИО, пол, возраст;

-название биологического материала и всех исследуемых показателей – кровь (плазма).

- дата получения пробы и, если это возможно, время получения;

- результаты исследования с указанием единиц, в которых должны быть выражены результаты ;

- фамилия и подпись сотрудника, выполнившего исследование.

**5 .Контроль качества иммуноферментного анализа**

**5.1. Порядок проведения контроля качества**

Комплексная система контроля качества клинических лабораторных исследований осуществляется путем:

- установления единых требований к аналитическому качеству количественных методов;

- ежесерийного выполнения процедур внутрилабораторного контроля качества с использованием контрольных материалов (оперативный контроль качества);

- регулярного участия в программах внешней оценки качества (ГОСТ Р 53133.1―2008) [4].

Внутрилабораторный контроль качества представляет собой систему повседневного слежения за точностью получаемых на биохимическом анализаторе результатов для поддержания стабильности аналитической системы, выявления и устранения недопустимых случайных и систематических погрешностей и заключается в сопоставлении результатов исследования проб с результатами исследования контрольного материала и измерении величины отклонения.

Проводится в соответствии с инструкцией к прибору и инструкцией к используемым контрольным материалам и требованиями стандарта ГОСТ Р 53133.2―2008 [5].

Внутрилабораторный контроль качества должен быть:

- систематическим, повседневным, проводиться по единым правилам, т.е. анализ контрольных проб должен включаться в обычный ход работы лаборатории;

- охватывать все области измерений (норма, высокие и низкие патологические значения);

- производиться в реальных условиях работы лаборатории (так же, как обычные пробы пациентов, т.е. тем же персоналом и в тех же условиях);

- объективным (желательно "шифровать" контрольный материал, чтобы исполнитель не знал, где опыт, а где контроль).

Принцип проведения ВКК для ИФА лабораторий достаточно прост: при каждой постановке анализа вместе с образцами сывороток пациентов нужно проводить измерение одного и того же контрольного материала, а результаты этих измерений заносить в контрольную карту Shewhart. В качестве контрольного материала для внутреннего контроля используется, как правило, внутрилабораторный стандарт (ВЛС), который (в отличие от международных или национальных стандартов) может быть приготовлен в лаборатории самостоятельно.

Хорошо организованная система внутреннего контроля качества позволяет достаточно эффективно выявлять ошибки, связанные с:

- внешними варьирующими факторами (реактивы, калибраторы, расходные материалы);

- внутренними варьирующими факторами (организация в лаборатории "домашних реактивов", обучение персонала, обслуживание приборов, ведение документации, реакция персонала на возникающие проблемы).