

- Все
- Предстоящие
- Прошедшие
- 2011 год
- 2010 год
- 2009 год
- 2008 год
- 2007 год
- 2006 год
- 2005 год

// Главная / Мероприятия / 05.09.2005 / Быстрые простые методы в системе лабораторной диагностики .

Быстрые простые методы в системе лабораторной диагностики

д.м.н., проф., засл. деятель науки России Носков Ф.С., к.х.н. Дробченко С.Н., проф. Кальво А., проф. Сэмюэльс Ф.
НИИЭМ им. Пастера, ЗАО «Биоград», СПб., Organics LTD, Израиль, Organics PBS, Франция,
<http://www.biograd.ru>

Прогресс в изучении и борьбе с большинством инфекционных заболеваний во многом определяется разработкой и внедрением новых методов лабораторной диагностики.

Сегодня развитие диагностики инфекционных заболеваний осуществляется в двух основных направлениях:

1. Создание сложных, высокочувствительных технических комплексов.
2. Создание быстрых простых тестов, для постановки которых не требуется специального оборудования.

Второе направление, является одним из приоритетных в лабораторной диагностике. Быстрые простые тесты, специально разработанные для использования в небольших лабораториях, также могут быть использованы в крупных клиниках и диагностических центрах. С целью уменьшения стоимости исследований, в 1992 году ВОЗ, признав точность и надежность быстрых простых тестов, разработала новую схему диагностики вирусных заболеваний. Данная схема основывается на трех стратегиях с использованием комбинации быстрых простых тестов и/или ELISA-тестов вместо комбинации ELISA/WESTERN BLOT. Выбор стратегии зависит от цели тестирования и от распространенности инфекции в обследуемой популяции. Стратегия 1 основывается на результатах одного быстрого простого теста или ELISA теста и применяется, в основном, для обследования доноров, в зонах повышенного риска при скрининге, при постановке диагнозов в группе зараженных при наличии у них симптомов. Стратегия 2 базируется на результатах двух быстрых простых тестов и/или ELISA и предназначена для обследования контингента с разной распространенностью инфекции. Третья стратегия, в которой используются 3 быстрых простых теста и/или ELISA, оправдана только для постановки диагноза в районах с очень низкой распространенностью инфекции.

Таблица 1

Рекомендации ВОЗ и UNAIDS по выбору стратегии тестирования в зависимости от цели тестирования и от распространенности ВИЧ инфекции в обследуемой популяции.

Цель тестирования	Распространенность ВИЧ инфекции		Стратегия тестирования
Безопасность переливания крови и пересадки органов		любая	1
Скрининг		> 10%	1
		<= 10%	2
Постановка диагноза	При наличии симптомов ВИЧ	> 30%	1
		<= 30%	2
	При отсутствии симптомов ВИЧ	> 10%	2
		<= 10%	3

На следующем слайде приведены схемы тестирования в соответствии с выбранной стратегией.

В соответствии с выбранной стратегией должны быть подобраны методы, обеспечивающие достоверные результаты. Независимо от метода наиболее высокие требования предъявляются к тестам, выбираемым для стратегии 1. Основопологающей характеристикой для отбора данных тестов является 100 – процентная чувствительность. При подборе тестов для стратегии 2 и 3 следует учитывать, что первый тест должен иметь наивысшую чувствительность, а второй тест должен иметь более высокую специфичность, чем первый. При правильно подобранных тестах для данной стратегии количество неопределенных результатов не должно превышать 5%.

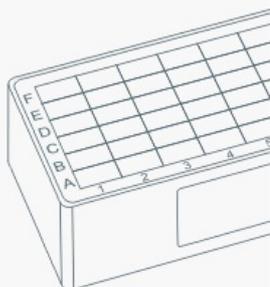


Рисунок 1

Схема стратегий тестирования, предложенных ВОЗ и UNAIDS.

Если подбору правильной комбинации тестов не уделять достаточного внимания – возможна ложная постановка диагноза. Правильный подбор комбинации тестов осуществляется на основании изучения характеристик различных методов. Это можно сделать на основании данных ВОЗ, приведенных на следующем слайде.

Таблица 2

Данные ВОЗ по характеристикам различных методов.

Как показали испытания, проведенные ВОЗ, быстрые простые тесты ИммуноКомб, по точности, достоверности, надежности определения не уступают, а в некоторых случаях и превосходят классический иммуноферментный анализ. При тестировании сероконверсионных панелей тесты ИммуноКомб выявляют позитивные сыворотки раньше, чем многие ELISA – тесты. Несмотря на то, что стоимость одного быстрого простого теста выше стоимости одного теста ELISA в ряде случаев использование ИммуноКомб экономически более выгодно. На следующем слайде представлена обобщающая таблица сравнения разных методов диагностики. Тесты ИммуноКомб, в отличие от ELISA и других технологий позволяют дифференцировать анализ, имеют внутренний контроль, в них отсутствует фон, что обеспечивает их высокую достоверность.

Таблица 3

Сравнение разных методов диагностики

	Иммунокомб	ELISA	Агглютинация	Хроматография/ Фильтрация
Точность	>95%	>95%	>80%	>90%
Многоанализная дифференциация	Да* (ВИЧ1 и ВИЧ2, др.)	Нет	Нет	Нет
Индивидуальный внутренний контроль	Да	Нет	Нет	Нет
Долговременное хранение результатов	Да – документальное хранение результатов	Нет	Нет	Нет
Дифференциация фона	Специфично	Неспецифично	Неспецифично	Специфично
Затраты при проведении малого числа определений	Минимальные для любого числа определений	Максимальные при проведении единичного определения	Минимальные для любого числа определений	Максимальные при проведении единичного определения

После определения метода, необходимого для данной стратегии следует выбрать наиболее подходящие тесты данного метода. На следующем слайде представлены наиболее известные в России тесты, прошедшие испытания ВОЗ, характеризующиеся высокой чувствительностью.

Таблица 3

Быстрые простые тесты, прошедшие испытания ВОЗ

Название (производитель)	Serodia-HIV-1/2 (Fujirebio)	CAPILLUS HIV-1/HIV-2 (Trinity Bio-tech plc)	ImmunoComb II BiSpot HIV 1&2 (PBS Orgen-ics)	GENIE II HIV-1/HIV-2 (Bio-Rad)
Отчет №	8	9	9	14
Чувствительность	100 (98.5-100.0)	100.0 (99.6-100.0)	100.0 (99.6-100.0)	100 (97.7 -100)
Специфичность	99.3 (98.5-100.0)	98.8 (97.6-100.0)	99.7 (99.1-100.0)	99.3 (98.1 -100)
Вариация интерпретации(%)	6.3	0.0	4.5	0.7
Цена за тест(\$)	2.8	2.2	1.7	2.55
Простота Выполнения	Сложный	Самый простой	Самый простой	Простой
Рекомендован как	Подходящий	Подходящий	Наиболее подходящий	Подходящий
Неопределенные результаты(%)	0	0	0.2	0.2

Из представленных данных видно, что наиболее подходящими для скрининга являются системы GENIE и ImmunoComb, как наиболее чувствительные и специфичные. Лучшим, для обследования доноров, признан тест ImmunoComb, т.к. он является наиболее простым в применении и его специфичность выше, чем у других отобранных тестов. Более того, при тестировании сероконверсионной панели было показано, что только тест ИммуноКомб определяет антитела к ВИЧ-1 раньше на 8,5 дней, чем референс-тест (ELISA ENZYGNOST). Остальные тесты

выявляли сыворотки данной панели позже, чем референс-тест.

Аналогичные испытания ВОЗ проводит для отбора быстрых простых тестов выявляющих поверхностный антиген вирусного гепатита В. Особенностью данных испытаний является оценка не только чувствительности и специфичности, но и результатов, полученных на сероконверсионных и низкотитражных панелях. На следующем слайде приведены результаты испытаний быстрых простых тестов 10 производителей, которые сравнивали с ELISA тест-системами Monolisa и Hepanostika. Столбцы диаграммы характеризуют количество выявленных положительными образцов низкотитражной и сероконверсионных панелей, синий и красный соответственно. Как видно из диаграммы тесты ИммуноКомб продемонстрировали результаты, близкие или превосходящие результаты ИФА референс-тестов на сероконверсионных и низкотитражных панелях.

Рисунок 1

Сравнительная характеристика тестов при определении образцов сероконверсионных и низкотитражных панелей



Количество образцов низкотитражной панели, идентифицированных тестом ИммуноКомб как содержащие HBsAg, совпадает с количеством образцов, выявленных референс-тестом Hepanostika и на один образец меньше, чем референс-тестом Mono-lisa. Количество образцов сероконверсионной панели, определенных тест-системами ИммуноКомб, превышает показатель референс-тестов. Все остальные тесты отставали от референс-тестов в определении положительных образцов этих панелей.

На основании проведенных испытаний ВОЗ рекомендует использовать быстрые простые тесты ИммуноКомб в качестве тестов, отобранных для стратегий.

Быстрые простые тесты ИммуноКомб - первые разрешенные в Российской Федерации диагностикумы для бесприборной детекции вирусных и бактериальных инфекций, успешно используются в клиниках России с 1992 года. Метод основан на принципе твердофазного ИФА. В качестве твердой фазы использован гребень из пластика с нанесенными на нем антителами или антигенами. В состав набора входят проявочные ванны, заполненные необходимыми реагентами для проведения анализа; положительные, отрицательные контроли, шкала для количественной оценки результатов, перфоратор для прокалывания фольги.

На следующем слайде показаны этапы анализа.



1. Для индивидуального тестирования гребешок можно согнуть и отломить необходимое количество зубцов. В ванночке вскрывается соответствующее числу зубцов количество ячеек. Невскрытые ячейки и неиспользованные зубцы хранятся в течение срока годности тест-системы.
2. В ряд А ванночки вносятся образцы (сыворотка, плазма или цельная кровь) и контроли.
3. Гребешок вставляется в ряд А и инкубируется (реакция антиген-антитело).
4. Гребешок перемещается из ряда в ряд ванночки в соответствии с инструкцией (промывки и связывание с конъюгатом).
5. Цветная реакция в ряду F.
6. Результат анализа в виде окрашенных точек.

Верхняя точка: внутренний контроль. Должна присутствовать и при положительных и при отрицательных образцах. Она подтверждает правильность работы тест-системы.

Нижняя точка (одна или две) появляется в случае наличия инфекции. Уровень видоспецифичных антител в каждом образце оценивается количественно с помощью цветной шкалы КомбСкейл, входящей в состав набора.

Сыворотку, плазму или цельную кровь вносят в ячейки ряда А ванны, затем опускают гребень в эти же ячейки. Гребень переносят из ряда в ряд ванны, осуществляя промывки, связывание с конъюгатом и окрашивающим веществом. Результат анализа появляется в виде окрашенного пятна на зубце гребня через 40 минут. Учет визуальный или полностью автоматизированный, на приборе КомбСкан. Достоверность анализа подтверждается наличием внутреннего контрольного пятна. Возможна постановка одного или нескольких анализов одновременно. Гребень имеет внутренние надрезы, позволяющие легко отделить необходимое количество зубцов, как показано на рисунке 1.

Приказами Минздрава России (322 от 21.10.2002г., 292 от 30.07.2001г, 336 от 07.09.2000г.) тестсистемы ИммуноКомб рекомендованы для проведения обследований доноров крови, органов и тканей человека, скрининговых исследований, а так же для подтверждения и арбитража результатов скрининговых исследований; проверены и одобрены институтом П. Эрлиха, А. Фурниэ; как наиболее высокочувствительные и специфичные сертифицированы CE для применения в клиниках Европы.

Технология ИммуноКомб позволяет диагностировать широкий спектр инфекций, таких как: СПИД, Гепатиты А, В, С, Цитомегалию, Токсоплазмоз, Хламидиоз, Краснуху, Хеликобактериоз.

На заключительном слайде приведены координаты ЗАО «Биоград». Оно было создано в 1992 году на базе института Пастера в Санкт-Петербурге для комплектации ИФА тест-систем ИммуноКомб производства Organics, Израиль и Organics, Франция, при поддержке Минздрава России.

ЗАО «Биоград» стало первым предприятием, инициировавшим диагностику скрытых инфекций таких как Хламидиоз, Torch-комплекс. На сегодняшний день партнерами ЗАО «Биоград» являются более 1050 Центров СПИД, Городских больниц, КВД, СПК, Центров ГСЭН почти во всех регионах России.

С 1992 г. ЗАО «Биоград» ведет активную разработку методических рекомендаций, содержащих информацию о последних достижениях в области медицинской диагностики. В первые годы особое внимание уделялось скрытым инфекциям. Был опубликован ряд методических пособий по Хламидийной инфекции. В последующие годы совместно с главным военно-медицинским управлением Министерства обороны были изданы методические рекомендации по иммунодиагностике вирусных гепатитов, совместно с Министерством здравоохранения Республики Карелия были изданы методические рекомендации по диагностике латентных инфекций. В прошлом году нами были изданы методические рекомендации Минздрава «Быстрые и простые методы определения вирусных инфекций в лабораторной службе России» - под редакцией академика Покровского. В конце 2005 г. планируется издание методических рекомендаций по Хеликобактериозу. Сегодня, мы вновь возвращаемся к проблемам скрытых инфекций с целью – обобщить тринадцатилетний опыт применяемых схем диагностики в клиниках России. Поэтому, в 2006 году, планируется издание по ToxH-комплексу и Хламидийной инфекции. К созданию всех методических рекомендаций мы привлекаем ведущих специалистов России и мира. В этих изданиях предусмотрена глава, в которой лечебные и диагностические учреждения могут опубликовать свои накопленные данные по проблемам диагностики вирусных и бактериальных инфекций в России. Мы призываем Вас, принять активное участие в обмене накопленным опытом.



Тест-системы
ИммуноКомб
для диагностики
Гепатитов А, В и С



Новые медицинские
технологии
диагностики и лечения
Хеликобактериоза