

ЗАСТОСУВАННЯ ШВИДКИХ ТЕСТІВ У ЛАБОРАТОРНІЙ ДІАГНОСТИЦІ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ

(методичні рекомендації)*

**В.П. Широбоков,² І.В. Дзюблик,¹ С.Г. Вороненко,¹ В.Г. Порохницький,¹
О.М. Вернер,¹ А.П. Міроненко,¹ О.О. Костенко¹**

¹Київська медична академія післядипломної освіти

²Національний медичний університет, Київ

Резюме. У запропонованих нових методичних рекомендаціях автори узагальнили найсучасніші матеріали, що широко представлені в науковій літературі, набутий власний досвід застосування швидких тестів, що зареєстровані в Україні, в діагностиці інфекційних хвороб, особливо таких актуальних, як вірусні гепатити, ВІЛ-інфекція/СНІД, грип, тощо. Не залишилися поза увагою авторів питання правильного вибору тестів, їх місця або «ніші» в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб та інтерпретації отриманих даних.

Методичні рекомендації призначені для лікарів-вірусологів, мікробіологів, епідеміологів, інфекціоністів, педіатрів, неонатологів, сімейних лікарів, хірургів широкого профілю, акушерів-гінекологів, стоматологів, наркологів, гастроентерологів, спеціалістів центрів СНІДу, фтизіатрів.

Ключові слова: швидкі тести, лабораторна діагностика, інфекційні хвороби.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЫСТРЫХ ТЕСТОВ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В.П. Широбоков, И.В. Дзюблик,

С.Г. Вороненко, В.Г. Порохницкий,

О.М. Вернер, А.П. Мироненко, О.А. Костенко

Резюме. В предложенных новых методических рекомендациях авторы суммировали современные материалы, которые широко представлены в научной литературе, собственный опыт использования быстрых тестов, зарегистрированных в Украине, в диагностике инфекционных заболеваний, особенно таких актуальных, как вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекция/СПИД, грипп и т.п. Не остались без внимания авторов вопросы правильного выбора тестов, их места в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний и интерпритации полученных данных.

Методические рекомендации предназначены для врачей-вирусологов, микробиологов, эпидемиологов, инфекционистов, педиатров, неонатологов, семейных врачей, хирургов широкого профиля, акушеров-гинекологов, стоматологов, наркологов, гастроэнтерологов, специалистов центров СПИДа, фтизиатров.

Ключевые слова: быстрые тесты, лабораторная диагностика, инфекционные заболевания.

DIAGNOSTIC OF INFECTIOUS DISEASE WITH RAPID TESTS-ASSISTING

V.P. Shirobokov, I.V. Dzyublyk,

S.G. Voronenko, V.G. Porokhitskiy,

O.M. Verner, A.P. Mironenko, O.A. Kostenko

Summary. In offered methodical recommendation modern data from science literature and from our own studies based on diagnostic of infectious disease with rapid tests-assisting (which are registered in Ukraine), especially HIV-infections/AIDS, viral hepatitis, influenzae etc. We considered questions directed to diagnostic of infectious disease and interpretation of obtained data.

This methodical recommendation intend for virologists, microbiologists, epidemiologists, infectiologists, pediatricians, specialists in neonatology, general practitioners, surgeons, obstetrician-gynecologists, stomatologists, experts in narcology, gastroenterologists, experts in AIDS treatment, phthisiatricians.

Key words: rapid tests, laboratory diagnostics, infectious disease.

Адреса для листування: Дзюблик Ірина Володимирівна

01112, Київ, вул. Дорогожицька, 9

Київська медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика МОЗ України

ВСТУП

Лабораторна діагностика інфекційних хвороб складається з класичних методів виділення збуд-

ників на відповідних поживних середовищах або у біосистемах з їх ідентифікацією та визначення приросту специфічних антитіл у парі сироваток хворих у серологічних реакціях (реакції нейтралізації, реакції гальмування гемаглютинації,

* Узгоджено начальником Головного Управління організації медичної допомоги населенню МОЗ України 20.05.2004

реакції зв'язування комплементу, реакції імунодифузії, преципітації та ін.). Як правило, ці методи пролонговані у часі, специфічна діагностика продовжується від 3–5 днів до 2–3-х тижнів. Між тим інфектологія потребує визначеності відносно етіології хвороби у більш стислий термін.

З другої половини ХХ століття почалася розробка методів експрес-діагностики інфекційних хвороб, за допомогою яких збудник або його антигени виявляють безпосередньо у клінічному матеріалі протягом декількох годин (робочого дня) і які з успіхом використовуються у лабораторній практиці й досі. Серед останніх — метод флюоресціюючих антитіл (МФА), реакція непрямой гемаглютинації (РНГА), реакція латексаглютинації (РЛА), імуоферментний аналіз (ІФА), радіоімунний аналіз (РІА) та інші. Дуже поширеними в останні роки стали методи виявлення окремих ділянок геномів збудників інфекційних хвороб, зокрема полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) у різних своїх модифікаціях. Використання саме цих методів значно прискорило етіологічну діагностику інфекційних хвороб. Але для виконання МФА, ІФА, РІА, ПЛР потрібні умови добре обладнаної потужної лабораторії та коштовне обладнання і апаратура, персонал, що має високу кваліфікацію, тощо.

Стратегія наближення медичних установ до пацієнта, тобто наявність медико-профілактичних закладів амбулаторного типу у територіально найвіддаленіших районах, де відсутні обладнані лабораторії, необхідність надання медичної допомоги, зокрема переливання крові, в ургентних умовах при виникненні критичних станів (травми, екологічні лиха, інші надзвичайні ситуації), потребували розробки і застосування більш простих у виконанні, але чутливих та специфічних методів лабораторної діагностики інфекційних хвороб. Насамперед саме для цих умов і були створені швидкі тести. Як свідчить світовий досвід, швидкі тести доцільно використовувати в інфектології для етіологічної лабораторної діагностики інфекційних хвороб, які є пріоритетними для охорони здоров'я країни. Це ВІЛ-інфекція/СНІД, вірусні гепатити В, С, грип, туберкульоз, сифіліс та інші. Більшість з цих інфекційних захворювань становить також ризик професійного зараження медичних працівників, які надають медичну допомогу інфікованим та хворим, і складають проблему нозокоміальних заражень у медико-профілактичних закладах.

Швидкі тести для специфічної етіологічної лабораторної діагностики інфекційних хвороб (вірусних гепатитів В і С, ВІЛ-інфекції, хламідіозу, сифілісу та ін.) — це прості у використанні діагностичні набори, які дозволяють отримати результат дослідження протягом декількох хвилин. Вони є альтернативою використанню класичних діагностичних тест-систем, бо не потребують застосування дорогого устаткування і

висококваліфікованого персоналу. Вони засновані на тих самих принципах імунологічних реакцій, застосуванні таких самих імунобіологічних продуктів, що і добре відомі класичні ІФА тест-системи. Їм притаманна висока чутливість та специфічність. В різних країнах світу, в тому числі і високорозвинутих, такі тести давно й успішно застосовуються не тільки в інфектології, але й у багатьох інших напрямках медицини. Вони необхідні як для поодиноких досліджень, так і у великому їх потоці, коли потрібно *швидко*, вірогідно і, що важливо, *недорого* одержати результат. Сьогодні такі швидкі тести випускають багато фірм-виробників. Впровадження швидкої діагностики на основі імунохроматографічного аналізу підтримують ВООЗ і Глобальний фонд, вони рекомендуються для застосування в міжнародних програмах по контролю за хворобами, що передаються статевим шляхом, в програмах, пов'язаних з ВІЛ-інфекцією/СНІДом та інших.

У Росії діагностика інфекційних хвороб із застосуванням зазначених швидких тестів проводиться вже протягом майже 10 років. За цей період основними споживачами виявили себе, насамперед, організації самостійних форм діяльності, консультативні кабінети, сімейні лікарі, лікарі швидкої та невідкладної медичної допомоги. Все більшу зацікавленість до швидких тестів проявляють керівники державних медичних установ і закладів, що мають не досить забезпечені лабораторії, проте бажають одержувати достовірні результати дослідження без використання дорогого устаткування.

У запропонованих нових методичних рекомендаціях автори узагальнили найсучасніші матеріали, що широко представлені в науковій літературі, набутий власний досвід застосування швидких тестів, що зареєстровані в Україні, в діагностиці інфекційних хвороб, особливо таких актуальних, як вірусні гепатити, ВІЛ-інфекція/СНІД, грип, тощо. Не залишилися поза увагою авторів питання правильного вибору тестів, їх місця або «ніші» в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб та інтерпретації отриманих даних.

Представлені **вперше** методичні рекомендації є результатом плідної спільної праці колективів двох кафедр провідних вищих навчальних закладів України — кафедри вірусології КМАПО ім. П.Л. Шупика та кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України.

Методичні рекомендації призначені для лікарів-вірусологів, мікробіологів, епідеміологів, інфекціоністів, педіатрів, неонатологів, сімейних лікарів, хірургів широкого профілю, акушерів-гінекологів, стоматологів, наркологів, гастроентерологів, спеціалістів центрів СНІДу, фтизіатрів.

1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ, ОБМЕЖЕННЯ ТА ВИМОГИ ДО ЗАСТОСУВАННЯ ШВИДКИХ ТЕСТІВ

За типом імунологічної реакції, яка лежить в основі створення тесту, та умов проведення дослідження сучасні швидкі тести можна розділити на декілька груп.

До **першої групи** належать швидкі тести, які є **ДОТ-варіантом твердофазного ІФА («Dot blot»-тести)**, і при використанні яких тверду фазу з реагентом занурюють у досліджуваний зразок. Такі тест-системи отримують все більше поширення в тих випадках, коли необхідно швидко отримати результат поодиноких аналізів в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб. Наприклад, за їх допомогою можна визначити маркери гепатиту В: HBsAg, анти-HBs, анти-HBc Ig M та Ig G; антитіла до ВІЛ1/2 та інші.

В таких тестах твердою фазою можуть бути, наприклад, полістиролові гребінки з 12 зубцями кожна, в яких на одне дослідження виділяється по 1 зубцю. На зубці гребінка нанесені по 2 реагуючі зони (для внутрішнього контролю та досліджуваної проби). Наприклад, в тест-системі, яка розроблена для визначення HBsAg в сироватці крові, на нижній ділянці кожного зубця гребінки адсорбовані анти-HBs антитіла, до яких при занурюванні зубців у досліджувану сироватку приєднується HBsAg (якщо він є в ній) з утворенням специфічного імунного комплексу. Утворений специфічний імунний комплекс виявляється, як і в класичному ІФА, внаслідок взаємодії з кон'югатом.

Важливо усвідомити, що занурювання зубців проводиться у спеціальну робочу ванну, що має 6 рядів по 12 лунок у кожному. В лунках робочої ванни міститься певний розчин реагенту, готовий до застосування на різних етапах постановки реакції. Тест проводиться поетапно, переміщенням гребінки або її окремого зубця, із ряду в ряд з відповідною інкубацією на кожному етапі. До початку роботи з тестом зразки сироватки крові або плазми додаються до розчинника, що міститься в першому рядку ванни. У **позитивному випадку** хромогенний субстрат в подальшому розкладається ферментом, утворюючи **кольорову пляму на гребінці**. Дослідження супроводжується внутрішнім, позитивним та негативним контролем. Облік результатів проводиться візуально. Тривалість дослідження — 3–4 години.

Другу групу швидких методів діагностики складають **імунохроматографічні тести**, при використанні яких досліджуваний зразок наносять на поверхню твердої фази-мембрани з попередньо нанесеним на ній реагентом, а результат аналізу має вигляд забарвленої смуги.

В основі імунохроматографічного аналізу (ІХА) лежить специфічна взаємодія антигенів і антитіл на хроматографічній мембрані після змочування її рідиною досліджуваного зразка або

буферним розчином. Така взаємодія відбувається внаслідок дифузного переміщення забарвленого колоїдним золотом (КЗ) індикаторного імунного компоненту ІХА, який заздалегідь нанесений на мембрану, та антигенів або антитіл досліджуваного зразка після нанесення останнього на мембрану. Для візуального виявлення специфічної імунної реакції в певній зоні-смугі хроматографічної мембрани попередньо жорстко сорбовані необхідні відомі компоненти додаткових імунологічних реакцій, які дозволяють сконцентрувати барвник у вигляді забарвленої смуги. Введений у тест-систему «з залишком» індикаторний забарвлений імунний компонент дифундує по хроматографічній мембрані далі від місця проявлення специфічної імунної реакції і зупиняється знов у контрольній смугі внаслідок імунологічної взаємодії з жорстко іммобілізованим там імунним компонентом іншої специфічності. Забарвлення контрольної смуги свідчить про те, що дослідження було проведене коректно.

У різних швидких ІХА-тестах використовують наступні три типи антитіл.

1. Мобільні моноклональні антитіла до досліджуваного антигену або антитіл, які кон'юговані з колоїдним золотом, тобто барвником. Такі антитіла нанесені на хроматографічний папір поблизу зони внесення фізіологічної рідини або досліджуваного зразка.
2. Поліклональні антитіла до досліджуваного антигену або антитіл, які жорстко адсорбовані у тестовій (досліджуваній) зоні тест-касети.
3. Вторинні антитіла до моноклональних антитіл, які жорстко іммобілізовані у контрольній зоні тест-касети.

В Україні зареєстрована низка швидких тестів для лабораторної діагностики інфекційних хвороб на основі ІХА.

Тест-касета в цих тестах являє собою нітроцелюлозну мембрану, заправлену у пластикову касету, на якій позначені: місце внесення зразка для дослідження (S), місце появи результатів специфічного тесту (T), місце розташування контрольної смуги (C), назва маркеру, для виявлення якого розроблений даний швидкий тест. Тест-касета запаена у пластиковий пакет разом з силікагелем та гепаринізованою піпеткою для внесення зразка. Тобто, **надані** для дослідження **матеріали** — це тест-касета, одноразова піпетка, буфер (тільки для дослідження цільної крові) та інструкція.

Необхідні, але не надані, матеріали: пробірки (тільки для венозної крові або сироватки чи плазми), ланцети (для взяття цільної крові з пальця), центрифуга (тільки для плазми), годинник або таймер.

При здійсненні швидкої діагностики інфекційних хвороб необхідно дотримуватись певних **застережень**:

- а) не використовувати тест-касети після закінчення терміну придатності;
- б) не можна палити, їсти, пити, застосовувати косметичку або маніпулювати з контактними лінзами у зонах, де відбувається підготовка зразків до дослідження та здійснюється тест-діагностика;
- в) поводитися зі зразками, як з потенційно інфікованим матеріалом, дотримуючись правил протиепідемічного режиму при дослідженні та при деконтамінації і знищенні відпрацьованого матеріалу, зокрема, працювати тільки у захисних рукавичках, а розлиті зразки або реактиви знезаражувати відповідними дезінфікуючими засобами;
- г) тест-касети необхідно зберігати при кімнатній температурі або у холодильнику (від 2 до 30 °С), оскільки волога та температура можуть впливати на результати тесту. Тест-касети зберігають у запаяному пакеті (з силікагелем для утримання необхідної вологості) до початку проведення дослідження.

УВАГА! Тест-касети не можна заморожувати! Найкраще їх зберігати при кімнатній температурі (+18 – +22 °С), не допускаючи температурні коливання в широких межах!

Збір зразка та його підготовка до дослідження: для експресного виявлення специфічних антигенів або антитіл досліджують або суцільну кров (з вени або з пальця), або сироватку, або плазму крові.

Для відбору суцільної крові з пальця потрібно:

- помити руки пацієнта водою з милом або протерти змоченою у спирті ваткою;
- рухами від зап'ястя до кінчиків пальців розім'яти середній або підмізинний пальці, не торкаючись місця проколу;
- проколоти шкіру стерильним ланцетом, витерти першу краплю крові;
- м'яко масажуючи палець, досягти утворення достатньої краплі крові;
- використовуючи піпетку, набрати нею приблизно 50 μ l крові, при цьому необхідно уникати утворення бульок, та внести весь об'єм крові у зону S (лунку) тест-касети;
- можна вносити досліджувану суцільну кров з пальця шляхом стікаючої краплі: підвести палець пацієнта зверху зони S на касеті та капнути дві краплі крові у центр лунки або торкнутися стікаючою краплею безпосередньо центру лунки (S);
- суцільну кров з пальця необхідно дослідити негайно, не зберігаючи.

Для отримання сироватки необхідно зібрати кров у ємкість без коагулянта, дати крові згорнутися, відділити сироватку якомога швидше, щоб уникнути гемолізу, і перенести її у окрему пробірку або флакон.

Для отримання плазми кров збирають у ємкість з коагулянтом, потім, після осідання формених елементів (центрифугуванням), відділяють плазму в окрему ємкість.

Сироватку і плазму вносять у зону S на касеті. Зразки сироватки і плазми крові можуть зберігатися протягом 3–7 днів при температурі +2 – +8 °С, для довготривалого зберігання — при температурі нижче -20 °С. Перед тестуванням заморожені зразки розморожують та ретельно перемішують.

УВАГА! Зразки не можна заморожувати та розморожувати декілька разів.

Суцільна венозна кров може зберігатися при температурі +2 – +8 °С та використовуватися для тестування протягом двох днів.

УВАГА! Заморожувати суцільну кров не можна.

У випадку необхідності транспортування зразки упаковують згідно з відповідними санітарно-епідемічними вимогами.

Перед використанням касету, буфер та зразки необхідно витримати при кімнатній температурі стільки часу, щоб їх температура дорівнювала кімнатній (15–30 °С).

ПОРЯДОК ДОСЛІДЖЕННЯ

- *Відкрити запаяний пакет*, витягнути тест-касету та розмістити на робочому столі горизонтально. Підготувати необхідне устаткування та протокол дослідження.
- *Для зразків суцільної крові з пальця* — наповнити піпетку кров'ю та видавити приблизно 50 μ l її у лунку S на касеті, після чого додати 1 краплю буферу (приблизно 40 μ l) та зазначити час.
- *Використовуючи краплю крові, що падає з пальця* — внести 2 краплі суцільної крові у центр лунки S на касеті, потім додати 1 краплю буферу та зазначити час.
- *Для зразків сироватки або плазми:* тримаючи піпетку вертикально, внести 3 краплі сироватки або плазми (приблизно 75 μ l) у лунку S на касеті та зазначити час.
- *Для зразків суцільної венозної крові:* тримаючи піпетку вертикально, внести 2 краплі суцільної венозної крові (приблизно 50 μ l) у лунку S на касеті, додати 1 краплю буфера (приблизно 40 μ l) та зазначити час.

У всіх варіантах дослідження дочекатися появи червоної смуги/смуг. Результат обліковувати через 15 хвилин. Не брати до уваги результати після 20 хвилин.

Тлумачення результатів дослідження швидкими тестами вказане у відповідних розділах методичних рекомендацій при детальній характеристиці конкретних специфічних тестів. Тест може оцінюватись, як позитивний, негативний або сумнівний. Як позитивний — при наявності двох чітких забарвлених смуг у зонах T та C (найчастіше), або як негативний — при наявності однієї забарвленої смуги (червона контрольна смуга) у зоні C. Поява червоної контрольної смуги підтверджує також і те, що був використаний достатній об'єм досліджуваного матеріалу (зразку) та дотримані всі необхідні умови тесту. Тест може оцінюватись як сумнівний

тоді, коли **контрольна смуга не проявляється** (схема).

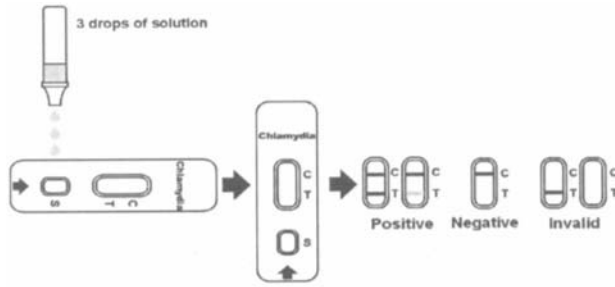


Схема. Тлумачення результатів дослідження.

Зовнішні контрольні реагенти до тест-касет не додаються, але рекомендовано використовувати позитивні (що мають специфічний імунний компонент, який досліджують) та негативні (що не мають специфічного антигену або антитіл, які досліджують) специфічні контролі, якщо тестування здійснюється в лабораторії і якщо вони є в лабораторії.

Швидкі тести, які використовують для лабораторної діагностики інфекційних хвороб, мають наступні обмеження.

1. Вони застосовуються виключно як методи якісної діагностики (є/немає), і не можуть визначати концентрацію або іншу кількісну характеристику антигенів або титр антитіл.
2. Як і у всіх випадках діагностики інфекційних хвороб, результати швидких тестів повинні братися до уваги у сукупності з повнотою наявності клінічної інформації.
3. Швидкі тести не виявляють антигенів або антитіл, якщо вони присутні в зразку в кількості, яка знаходиться за межею чутливості методу (наприклад, для визначення HBsAg він має бути в зразку в кількості, не меншій за 1 нг/мл).
4. Відносна чутливість більшості швидких тестів дорівнює 99%, відносна специфічність їх близько 98%.

УВАГА! Негативні результати, отримані швидкими тестами, не вимагають подальшої верифікації (підтвердження).

ВИМОГИ ДО ВИКОРИСТАННЯ ШВИДКИХ ТЕСТІВ

- Лікувально-профілактичні заклади (ЛПЗ) та станції переливання крові (СПК) отримують швидкі тести для лабораторної діагностики інфекційних хвороб згідно з розпорядженням головного лікаря ЛПЗ або СПК.
- Для проведення досліджень використовуються лише зареєстровані в Україні швидкі тести.
- До початку застосування швидких тестів в лабораторії або іншому відділенні ЛПЗ або СПК фахівці, які будуть проводити та оцінювати результати дослідження, повинні пройти відповідну підготовку.
- Не рекомендується проводити дослідження більше 3–4 зразків одним працівником одночасно.

- Тлумачення результатів доцільно здійснювати двома фахівцями; в екстрених випадках дозволяється оцінювати результат аналізу одним працівником.
- Приміщення для проведення досліджень швидкими тестами рекомендовано обладнати холодильником, ємностями для інактивації використаних тестів та зразків, що досліджувалися, за необхідності — центрифугою і термостатом.
- Результат дослідження на ВІЛ-інфекцію реєструють у формі №498/о «Журнал протоколів проведення лабораторної діагностики інфекційних хвороб за допомогою швидких тестів», яка має знаходитись у лабораторії або відділенні ЛПЗ, СПК за місцем проведення дослідження.
- При отриманні негативного результату у відділення надається форма №209/о «Результат аналізу», яка зберігається у «Медичній карті стаціонарного хворого» — форма №003/о або в «Історії пологів» — форма № 096/о, або в «Медичній карті донора», або в іншій медичній документації.
- При отриманні позитивного або сумнівного результату дослідження зразків швидкими тестами подальші дії мають відповідати певним наказам МОЗ України. Наприклад, при отриманні позитивного результату швидкими тестами на ВІЛ-інфекцію подальші дії регламентовані наказом МОЗ України №120 від 25.05.2000 «Про вдосконалення організації медичної допомоги хворим на ВІЛ-інфекцію/СНІД» та діючими інструкціями у закладах служби крові.

Третю групу швидких тестів складають аглютинаційні тести, в основу яких покладене специфічне склеювання сенсibilізованих антигенами або антитілами еритроцитів (реакція непрямої аглютинації-РНГА) і часток латексу (реакція латекс аглютинації — РЛА).

РНГА традиційно застосовують в лабораторній діагностиці багатьох вірусних інфекцій, в тому числі гепатиту В. Цей метод менш чутливий, ніж ІФА, але в найкращих еритроцитарних діагностичумах чутливість реакції досягає 10 нг білку на 1 мл сироватки. Наведемо приклад застосування РНГА для виявлення HBsAg ВГВ.

Принцип методу: на формалінізованих еритроцитах фіксовані анти-НВs (це і є еритроцитарний діагностичум), які при наявності HBsAg формують з ним імунологічний комплекс, що спричинює гемаглютинацію, тобто зсідання еритроцитів на дно лунки планшету в формі перевернутої парасольки. У випадку негативного результату еритроцити з діагностичуму осідають на дно лунки «гудзиком». Постановку РНГА супроводжують відповідними контролюми. Важливим етапом проведення РНГА є підтвердження отриманих позитивних результатів в нейтралізаційному тесті специфічності (ефект

гемаглютинації гальмують додаванням специфічних анти-HBs імуноглобулінів). Тривалість аналізу — біля 1 години.

2. ДІАГНОСТИКА ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

2.1. ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ В

Гепатит В є однією з найактуальніших проблем інфектології. Це пов'язано не тільки з досить важким перебігом цієї хвороби у певної частини хворих, але і з хронізацією її у 6–10% дорослих та у 70–90% дітей першого року життя, а також з подальшою еволюцією хвороби у цироз печінки та гепатоцелюлярну карциному. В Україні зареєстровано близько 1 млн хворих на хронічний гепатит В, які є джерелом цієї інфекції для оточуючих. Особливості епідемічного розповсюдження гепатиту В, збудник якого передається парентеральним шляхом, включають існування груп людей з підвищеним ризиком зараження цією інфекцією. Серед них і медичні працівники, особливо хірургічних та стоматологічних спеціальностей. В умовах виникнення аварійної ситуації під час надання невідкладної медичної допомоги хворому застосування швидких тестів етіологічної діагностики гепатиту В є безумовно доцільним і виправданим, оскільки допоможе медичному працівнику вжити заходів екстреної профілактики гепатиту В. У практиці дільничного терапевта, педіатра та сімейного лікаря невеликих районних лікарень, сільських амбулаторій швидкі тести допоможуть зорієнтуватись у етіологічному діагнозі гепатиту, скласти уяву про стан здоров'я пацієнта при оформленні медичної картки або картки здоров'я особи, тощо.

Цито-тест для виявлення HBsAg (Cito Test HBsAg)

Хроматографічна мембрана для визначення HBsAg ВГВ має у своїй стромі декілька компонентів: у зоні внесення досліджуваного зразка крові на ній сорбовані моноклональні антитіла до HBsAg ВГВ, кон'юговані з колоїдним золотом. На ній же в місці, позначеному Т (тест), жорстко фіксовані у вигляді смуги поліклональні антитіла до HBsAg та далі по мембрані у зоні контролю (С) іммобілізовані імунні компоненти для проявлення контрольної смуги (смуги безбарвної до початку дослідження).

Після внесення у певну позначену «S» зону нітроцелюлозної мембрани досліджуваного зразка він змочує мембрану, внаслідок чого відбувається дифузія HBsAg (якщо він є у зразку) та кон'югованих з КЗ (барвником) специфічних антитіл уздовж мембрани до тестової смуги і далі. У процесі переміщення уздовж мембрани ці компоненти можуть специфічно взаємодіяти між собою та продовжують рух у напрямленні зони Т. Саме у місці розташування тестової смуги Т знов відбувається специфічна імунологічна взаємодія HBsAg або комплексу HBsAg — моноклональні

антитіла, мічені КЗ, тепер вже з поліклональними анти-HBs антитілами, що сорбовані на мембрані, з утворенням своєрідного бутерброду і накопиченням барвника. В результаті такої взаємодії з'являється смуга червоного кольору. Подальша дифузія залишків кон'югату до зони С призводить до певної імунологічної взаємодії з утворенням контрольної червоної смуги, яка є свідченням правильно проведеного аналізу досліджуваного зразка.

Тлумачення результатів наступне.

- *Тест позитивний* — поява двох чітких ліній червоного кольору. Одна лінія повинна проявитися в зоні тесту Т, а інша — зоні контролю С. Позитивний результат означає наявність HBsAg в досліджуваному зразку крові. Яскравість смуги у зоні Т може змінюватись в залежності від концентрації антигену у зразку. Тому *поява смуги будь-якої яскравості і відтінку червоного кольору у зоні Т повинна розглядатись як позитивний результат*.
- *Тест негативний* — тільки одна червона смуга з'являється у зоні контролю (С). Смуги в зоні тесту (Т) немає. Негативний результат свідчить про відсутність HBsAg у досліджуваному зразку крові.
- *Тест сумнівний* — контрольна смуга не проявляється. Була використана недостатня за об'ємом кількість зразка або невірно здійснена процедура тесту. Потрібно повторити тест, використовуючи іншу нову тест-касету. Якщо проблема залишається, необхідно припинити дослідження та зв'язатись з місцевим дистриб'ютором.

Розроблений і готовий до застосування в Україні новий цито-тест для виявлення HBsAg — ультра-тест для дослідження сироватки або плазми крові. Принципова схема його така ж сама, проте, чутливість цього тесту сягає 0,5 нг/мл.

Цито-тест для виявлення HBeAg (Cito Test HBeAg)

За такою ж принциповою схемою твердо-фазного ІХА розроблений **швидкий тест для експресного визначення HBeAg**, який є розчинною формою корівського білку ВГВ, і, на відміну від нього, виявляється у біологічних рідинах інфікованої людини. Визначення HBeAg свідчить про активну репродукцію ВГВ в організмі пацієнта, тому його називають антигеном інфекційності.

Тлумачення результатів наступне.

- *Тест позитивний* — поява двох червоних смуг — однієї у зоні тесту Т, другої у зоні контролю С, — свідчить про наявність HBeAg у досліджуваному зразку крові.
- *Тест негативний* — поява тільки однієї червоної смуги у зоні контролю С свідчить про відсутність HBeAg у досліджуваній сироватці або плазмі крові, а також про те, що дослідження відбулося коректно.

- *Тест сумнівний* — при відсутності забарвлених смуг у зонах Т та С. Можливо, процедура дослідження була здійснена з помилкою, або була внесена недостатня кількість реагентів.

Деякі швидкі тести, дозволяють ефективно діагностувати гепатит В шляхом виявлення в цільній крові (достатньо 0,1 мл) **HBsAg та HBeAg одночасно**.

Такий швидкий тест може являти собою прямокутну «книжечку» розміром 7,5×6,0 см.

Принцип методу та хід дослідження. На дослідній нітроцелюлозній мембрані (на лівому боці розкритої книжечки) у верхній її частині адсорбовані антитіла до HBsAg, HBeAg та контрольні імуноглобулінові комплекси, мічені колоїдним золотом. До них дифундують вказані антигени ВГВ, якщо вони обидва є в досліджуваній краплі крові, котра наноситься на нижню частину тої ж мембрани. Утворюються мічені золотом комплекси HBsAg-анти-HBs та HBeAg-анти-HBe.

На правому боці розкритої книжечки розміщена тестова нітроцелюлозна мембрана (НЦМ), в строму якої імпрегновані три невидимі поперечні смуги, що містять: верхня — антитіла до контрольних імуноглобулінових комплексів, середня — антитіла до HBeAg, нижня — антитіла до HBsAg. Після закривання книжечки контрольні та утворені специфічні комплекси (якщо вони є) дифундують в тестову НЦМ та зв'язуються відповідно з вищезгаданими антитілами в ній, формуючи забарвлені в темно-рожевий колір чіткі смуги.

Ці смуги реєструють візуально у відкритому віконці книжечки.

Для дослідів використовують венозну або капілярну кров, останню відбирають каліброваним капіляром (є в тест-системі) в об'ємі 0,1 мл після проколу пальця. Капілярну кров треба використати для тесту негайно, венозну можна зберігати до трьох днів при температурі від 4 до 8°C.

Тривалість дослідження — 3 хвилини до появи забарвлених смуг. У випадку негативного результату чекають 15 хвилин.

Швидкий тест для визначення антитіл до розчинного HBeAg (анти-HBe)

Базується на імунохроматографічній взаємодії рекомбінантного HBeAg, міченого колоїдним золотом з антитілами досліджуваної сироватки (плазми) крові, а також на імунній взаємодії їх комплексу з іншими відповідними компонентами, жорстко іммобілізованими у зонах Т та С. Проявом такої взаємодії є утворення смуг червоного кольору.

Тлумачення результатів ІХА для визначення анти-HBe:

- *тест позитивний* — поява двох чітких червоних смуг у зоні тесту Т та у зоні контролю С свідчить про наявність антитіл до анти-HBe у досліджуваному зразку крові;

- *тест негативний* — поява однієї забарвленої смуги у зоні контролю С, яка свідчить про відсутність анти-HBe антитіл у досліджуваному зразку крові;

- *тест сумнівний* — відсутність смуги у зоні контролю С свідчить про зроблену процедурну помилку або про внесення недостатньої кількості реагентів. Аналіз треба повторити з новою тест-системою.

В Україні зареєстрований **Cito-тест для виявлення антитіл до серцевинного (корівського) антигену ВГВ — анти-HBc IgG у сироватці або плазмі крові.**

Принцип тесту. Дослідження анти-HBc IgG базується на конкурентному ІХА-аналізі. Хроматографічна мембрана для визначення анти-HBc до ВГВ має у своїй стромі декілька компонентів: у зоні внесення досліджуваного зразка крові на ній сорбований рекомбінантний HBsAg, кон'югований з колоїдним золотом. На ній же в зоні Т (тест) жорстко фіксовані у вигляді смуги поліклональні антитіла до HBsAg, та далі по мембрані у зоні С іммобілізовані контрольні імунні компоненти ІХА. Після внесення у зону S нітроцелюлозної мембрани досліджуваного зразка він змочує мембрану, внаслідок чого відбувається дифузія специфічних антитіл до HBc-антигену (якщо вони є у зразку) та кон'югованого з КЗ (барвником) HBsAg уздовж мембрани до тестової смуги і далі. У процесі переміщення уздовж мембрани ці компоненти специфічно взаємодіють між собою з утворенням комплексу антиген-антитіло, при цьому антигенні детермінанти HBsAg зв'язані поліклональними постінфекційними антитілами досліджуваної сироватки. При досягненні зони Т імунні комплекси анти-HBc — HBsAg-КЗ не взаємодіють з поліклональними антитілами тієї ж самої специфічності, що жорстко сорбовані у зоні Т, бо HBsAg вже конкурентно заблокований сироватковими анти-HBc. Як наслідок, у місці розташування тестової зони барвник не накопичується і смуга червоного кольору не проявляється. Подальша дифузія вищезгаданих імунних комплексів або, при відсутності анти-HBc у зразку, кон'югату HBsAg з КЗ до зони С призводить до утворення контрольної червоної смуги, яка є свідченням правильно проведеного аналізу досліджуваного зразка.

Тлумачення результатів конкурентного ІХА для визначення анти-HBc IgG:

- *тест позитивний* — поява однієї червоної смуги у зоні контролю С і відсутність червоної смуги у зоні тесту Т свідчить про наявність антитіл до корівського антигену ВГВ у досліджуваній сироватці крові;
- *тест слабо позитивний* — на додаток до смуги червоного кольору у зоні контролю С з'являється тьмяна смуга рожевого кольору у зоні тесту Т, що є свідченням про наявність незначної кількості антитіл у досліджуваній сироватці;

- *тест негативний* — поява двох чітких забарвлених смуг у зонах тесту Т та контролю С, які свідчать про відсутність анти-НВс у досліджуваній сироватці/плазмі крові;
- *тест сумнівний* — відсутність смуги у зоні контролю С свідчить про зроблену процедурну помилку або про внесення недостатньої кількості реагентів. Аналіз треба повторити з новою тест-системою.

Лікарям запропонований і комбінований Cito-тест, за допомогою якого можна одночасно виявити основні маркери гепатиту В: HBsAg/HBsAb, HBeAg/HBeAb, HBcAb.

Cito-тест є абсолютно необхідним і доцільним в інфектології. Так, визначення **HBsAg** є необхідним для етіологічної діагностики гострого або хронічного гепатиту В. Дослідження **анти-НВс** доцільно проводити для контролю рівня поствакцинального імунітету після застосування профілактичної вакцинації проти гепатиту В. Велике прогностичне значення у діагностиці гепатиту В має виявлення пари маркерів: **HBeAg** та **анти-НВе** антитіл. Якщо останні з'являються у пацієнта після зникнення **HBeAg** (через 3–5 тижнів від початку захворювання), така сероконверсія свідчить про формування гострої продуктивної інфекції, котра закінчиться повним одужанням. Пролонговане у часі визначення **HBeAg** і відсутність **анти-НВе** може оцінюватись як формування хронічного гепатиту В. Наявність **анти-НВс** є свідченням хронічного або перенесеного у минулому гострого продуктивного гепатиту В. Виходячи з цього, такий маркер інфекції, як **анти-НВс** антитіла, може бути показником до вакцинації проти гепатиту В: відсутність **анти-НВс** свідчить про необхідність вакцинації, і навпаки.

Комплексне визначення всіх маркерів одночасно у динаміці гострого гепатиту В складає повну картину клінічного перебігу гепатиту В і його прогноз.

Остаточний діагноз гепатиту В не може бути встановлений тільки за результатами швидких тестів. Обов'язковим є співставлення результатів тестів з клінічними та іншими лабораторними методами дослідження. Між тим негативний результат ІХА на гепатит В є достовірним.

2.2. ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С

Гепатит С є проблемою не тільки інфектології, вона актуальна для лікарів гастроентерологів, терапевтів, онкологів. Гепатит С називають «лагідним» вбивцею, маючи на увазі переважно легкий перебіг хвороби у гострій стадії, але в подальшому відбувається хронізація інфекційного процесу у 80% осіб. В основі хронізації лежить безпрецедентна мінливість збудника у квазіваріантах, яку не може зупинити й подолати імунна система хворої людини. Наслідком хронізації гепатиту С є розвиток цирозу печінки та гепатоцелюлярної карциноми у значної кількості

хворих. В світі (за оціночними даними різних експертів) зареєстровано від 150 до 500 млн хворих на гепатит С, в Україні така реєстрація розпочалася лише з 2003 р. Як і гепатит В, гепатит С передається парентеральним шляхом, існують групи людей з підвищеним ризиком зараження цією інфекцією. Серед них на першому місці — ін'єкційні споживачі наркотиків, ВІЛ-інфіковані, реципієнти крові та органів, хворі, що знаходяться на гемодіалізі, тощо. До групи такого ризику відносять і медичних працівників, особливо хірургічних та стоматологічних спеціальностей.

Швидкі тести будуть, безумовно, корисними для екстренної етіологічної діагностики гепатиту С в умовах виникнення аварійної ситуації під час надання медичної допомоги хворому, інфікованому ВГС.

Така діагностика допоможе, у разі потреби, своєчасно застосувати специфічну комплексну антивірусну терапію, і зменшити ризик хронізації гепатиту С з подальшою згаданою небезпечною еволюцією хронічного гепатиту С. Швидкі тести для етіологічної діагностики гепатиту С знайдуть свою нішу застосування у практиці дільничного терапевта, педіатра та сімейного лікаря територіально віддалених лікувально-профілактичних закладів охорони здоров'я України.

За допомогою швидких тестів визначають **антитіла до ВГС** у суцільній крові, її сироватці та плазмі.

Цито-тест для виявлення анти-НСV-антитіл (Cito Test HCV)

Принцип тесту. Базується на застосуванні в ІХА-аналізі імунологічної взаємодії рекомбінантного антигену ВГС, що жорстко сорбований на нітроцелюлозній мембрані, з **анти-НСV** досліджуваного зразка. Хроматографічна мембрана для визначення **анти-НСV** має у своїй стромі такі компоненти: у зоні внесення досліджуваного зразка крові на ній нанесений білок А золотавого стафілококу (штам Cowan), який має здатність вибірково зв'язуватись з С-фрагментом імуноглобулінів, тобто, антитіл. Білок А кон'югований з барвником — колоїдним золотом. На ній же в зоні Т (тест), жорстко фіксований у вигляді смуги рекомбінантний **НСVAg**, та далі на мембрані у зоні С (контроль) іммобілізовані відповідні імунні компоненти ІХА. При нанесенні досліджуваного зразка на мембрану він змочує її, внаслідок чого відбувається дифузія **анти-НСV** (при їх наявності в зразку) і міченого КЗ протеїна А. **Анти-НСV IgG** зв'язуються своїм С-фрагментом з протеїном А, міченим барвником, і утворені комплекси антитіл з барвником, хроматографічно просовуючись уздовж мембрани, досягають місця розташування **НСVAg** у зоні Т. Імунологічна взаємодія комплексу **анти-НСV IgG**–білок А–КЗ з антигеном призводить до формування специфічних імунних комплексів і накопи-

чування барвника та появи смуги червоного кольору. Подальша дифузія вищезгаданих імунних комплексів або, при відсутності анти-НСV у зразку, кон'югату білка А з КЗ до зони С призводить до певної імунологічної взаємодії їх з контрольними компонентами з утворенням контрольної червоної смуги, яка є свідченням правильно проведеного аналізу досліджуваного зразка.

Тлумачення результатів конкурентного ІХА для визначення антитіл до НСV:

- *тест позитивний* — поява двох чітких червоних смуг — у зоні тесту Т та у зоні контролю С свідчить про наявність антитіл до вірусу гепатиту С у досліджуваному зразку крові;
- *тест негативний* — поява однієї забарвленої смуги у зоні контролю С, яка свідчить про відсутність анти-НСV у досліджуваному зразку крові;
- *тест сумнівний* — відсутність смуги у зоні контролю С свідчить про зроблену процедурну помилку або про внесення недостатньої кількості реагентів. Аналіз треба повторити з новою тест-системою.

Остаточний діагноз гепатиту С може бути встановлений тільки за результатами швидких тестів, враховуючи аналіз результатів тестів з клінічними та іншими лабораторними методами дослідження. Між тим негативний результат на гепатит С є достовірним.

2.3. ВІЛ-ІНФЕКЦІЯ/СНІД

ВІЛ-інфекція/СНІД набула в Україні загрозливого епідемічного поширення. За останніми оціночними даними експертів ВООЗ більше 1% населення країни вже є ВІЛ-інфікованими. У глобальному масштабі ВІЛ-інфекція/СНІД вийшла на четверте місце серед причин смертності.

ВІЛ-інфекція є захворюванням з природними (статевий і від матері до дитини) та штучним парентеральним шляхами передачі збудника. В структурі груп ризику підвищеної захворюваності на ВІЛ-інфекцію в Україні понад 60% займають ін'єкційні споживачі наркотичних речовин, росте відсоток інфікованих ними статевим шляхом їх сексуальних партнерів, насамперед, жінок, і, як наслідок, збільшується відсоток ВІЛ-інфікованих новонароджених дітей. В цьому плані ВІЛ/СНІД загрожує існуванню нації. Нагляд за поширенням ВІЛ-інфекції в Україні здійснюється шляхом лабораторного обстеження певних груп населення. Свою нішу тут знаходять і швидкі тести для лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції/СНІДу.

Цито-тест ВІЛ1/2 (Cito Test HIV 1/2)

Принцип тесту. Виявлення антитіл до збудників імунодефіциту 1-го і 2-го типів (ВІЛ1/2) — базується на застосуванні в ІХА-аналізі імунологічної взаємодії рекомбінантних антигенів ВІЛ1/2, що жорстко іммобілізовані на

нітроцелюлозній мембрані, з анти-ВІЛ1/2 досліджуваного зразка.

Хроматографічна мембрана для визначення анти-ВІЛ1/2 має у своїй стромі наступні компоненти: у зоні внесення досліджуваного зразка крові на ній нанесені рекомбінантні антигени вірусів імунодефіциту людини 1 і 2 типів, які кон'юговані з барвником — колоїдним золотом. На ній же в зоні Т (тест) жорстко фіксовані у вигляді смуги (до аналізу безбарвної) рекомбінантні антигени ВІЛ1/2, та далі на мембрані у зоні С іммобілізовані контрольні імунні компоненти. Після внесення досліджуваного зразка крові, який змочує мембрану, відбувається дифузія анти-ВІЛ1/2 (при наявності в зразку) та антигенів ВІЛ, мічених барвником. Протягом дифузії вони взаємодіють один з одним, утворюючи імунні комплекси ВІЛ1/2Ag — анти ВІЛ1/2, хроматографічно просовуються далі уздовж мембрани, досягають місця розташування ВІЛ1/2Ag на мембрані у зоні Т і знову імунологічно взаємодіють з останніми, що призводить до формування специфічних імунних комплексів і накопичування барвника. У зоні Т з'являється чітка смуга червоного кольору. Подальша дифузія вищезгаданих імунних комплексів або, при відсутності анти-ВІЛ1/2 у зразку, кон'югату ВІЛ1/2Ag з КЗ до зони контролю С призводить до утворення контрольної червоної смуги, яка є свідченням правильно проведеного аналізу досліджуваного зразка.

Тлумачення результатів ІХА для визначення антитіл до ВІЛ1/2Ag:

- *тест позитивний* — поява двох чітких червоних смуг у зоні тесту Т та у зоні контролю С свідчить про наявність антитіл до анти-ВІЛ1/2 у досліджуваному зразку крові;
- *тест негативний* — поява однієї забарвленої смуги у зоні контролю С, яка свідчить про відсутність анти-ВІЛ1/2 у досліджуваному зразку крові;
- *тест сумнівний* — відсутність смуги у зоні контролю С свідчить про зроблену процедурну помилку або про внесення недостатньої кількості реагентів; аналіз треба повторити з новою тест-системою.

Остаточний діагноз ВІЛ-інфекції не може бути встановлений тільки за результатами швидких тестів.

2.4. ГРИП

Враховуючи факт надзвичайної поширеності грипу та більш, ніж двадцятивідсоткове ураження населення щороку, проблема лабораторної діагностики грипу є значною. Необхідність коректного та швидкого встановлення діагнозу грипу постає при проведенні диференційної діагностики, особливо у дітей та в тяжких випадках у дорослих, а також перед призначенням етіотропної протигрипової терапії специфічними протигриповими хіміопрепаратами.

Крім того, на сьогоднішній день світ опинився на порозі виникнення нової пандемії грипу, що буде викликана принципово новим для людини зміненим антигенним варіантом вірусу грипу А, вірогідно, пташиного походження. Для підготовки до майбутньої пандемії за завданням ВООЗ були створені швидкі тести на грип.

Для лабораторної діагностики грипу загально-вживаними є **класичні методи**. Таких налічується декілька, причому кожен з них має свої позитивні сторони та свої нижченаведені **недоліки**.

1. Виділення вірусу від хворого на курячих ембріонах або на культурі перещеплюваних клітин MDCK. Факт виділення вірусу є абсолютно точним підтвердженням грипу у хворої людини. Однак, метод потребує часу: від 2 діб і більше. Крім того, далеко не у всіх випадках вдається виділити вірус від хворого.
2. Експрес-метод діагностики — імунофлуоресцентний метод визначення антигену грипу у відбитках з носу з використанням флуоресціюючих антитіл. Метод дозволяє швидко встановити діагноз «грип», але має обмежену точність і потребує спеціального обладнання (люмінесцентного мікроскопу), а для його виконання — висококваліфікованого спеціаліста не менш, ніж з дворічним досвідом роботи цим методом.
3. Серологічний метод — визначення антитіл до вірусів грипу у парних сироватках крові хворих, відібраних з інтервалом у 10–14 днів. Метод досить точний, але використовується лише для ретроспективної діагностики.
4. Імуноферментний метод — точність методу достатня, але виконання його потребує, крім тест-систем, ще й спеціального обладнання.

Використання швидких тестів на грип А та В дозволяє швидко і досить точно встановити діагноз «грип», не відходячи від ліжка хворого. Чутливість та специфічність тесту — 95%.

Швидкий тест на грип А та В

Принцип тесту. Тест є імунохроматографічним для якісного визначення антигенів вірусу грипу А та В (нуклеопротейнів) у носо-горлянкових змивах від хворих. Завдяки наявності на тест-касеті двох окремих мембран, він дозволяє визначити присутність антигену вірусу грипу А або В. Під час проведення дослідження носогорлянковий змив додається у лунку тест-касети. Під дією капілярної сили рідина просувається вздовж мембран. Якщо у досліджуваному зразку присутній антиген вірусу грипу А чи В, він зв'язується кон'югованими антитілами до вірусу грипу анти-А або анти-В. При цьому утворюється смуга, яку видно, як результат формування імунного комплексу антитіло-антиген-антитіло, що покрито кольоровими частками у тест-зоні (Т). Антитіла, покриті кольоровими частками, не зв'язані у тест-зоні, захоплюються в контрольній зоні (С) козячими протимишиними антитілами. Візуально лінія у контрольній зоні завжди має

з'являтися для підтвердження, що тест виконано коректно.

Тлумачення результатів наступне.

- *Тест позитивний* — *поява двох чітких смуг*. Якщо антиген вірусу грипу А або В у зразку присутній, то у відповідному вікні з'являється чорна смуга у тест-зоні (Т) і одна — у контрольній зоні (С).
- *Тест негативний* — *поява однієї забарвленої смуги у зоні контролю К*. Якщо антиген вірусу грипу відсутній, з'являється лише одна чорна смуга у контрольній зоні (С).
- *Тест сумнівний* — *відсутність смуги у зоні контролю С*. Якщо не з'явилася чорна смуга у контрольній зоні, тест може бути зіпсований або при дослідженні додано недостатню кількість зразка. Тест слід повторити.

3. ДІАГНОСТИКА ІНФЕКЦІЙ, ВИКЛИКАНИХ БАКТЕРІЯМИ

В основу оцінки принципів та методів мікробіологічної діагностики інфекційних хвороб, як відомо, покладені наступні критерії:

- достовірність принципу, методу, тобто їх надійність для точної постановки діагнозу;
- безпечність принципу, методу для хворого, лікаря, оточуючих;
- доступність принципу, методу для широкого використання у практиці, тобто його простота;
- принцип, метод повинні бути ранніми, тобто дозволяти ставити діагноз інфекційного захворювання якомога раніше.

Саме дотримуючись цих підходів, ми будемо висвітлювати розділ, присвячений швидкій діагностиці інфекцій, викликаних бактеріями.

3.1. Сифіліс

Щороку в світі реєструється близько 12 млн свіжих випадків сифілісу. Нині в багатьох країнах світу відзначається стабілізація або навіть зниження рівня захворюваності на сифіліс, однак це не стосується України. Сучасний етап розвитку проблеми сифілісу в Україні характеризується не тільки високим рівнем захворюваності, але й тим, що в переважній кількості випадків спостерігаються скриті форми та нетипові прояви захворювання, резистентність до хіміотерапії. Основними факторами, що вплинули на зростання захворюваності, є вживання наркотичних речовин, висока поширеність проституції серед молоді, незахищені статеві контакти, епідемія ВІЛ-інфекції/СНІДу та алкоголізм.

Дослідження крові донорів на маркери сифілісу є сьогодні обов'язковим заходом для служби крові в багатьох країнах світу. Серологічна діагностика сифілісу є провідною та найбільш доступною. Широко застосовуються реакція Вассермана і RPR (rapid plasma reagin) тест, кардіоліпіновий тест, реакції гемаглютинації (РГА) та мікропреципітації, реакція іммобілізації

трепонем (*Treponema pallidum*), імунофлуоресценції та ІФА.

Нещодавно була введена в лабораторну практику швидка діагностика сифілісу на імунохроматографічній смугі або у форматі латерального потоку. Для дослідження відбирається кров з пальця або з вени, час проведення — не більше 10–15 хвилин. Хроматографічні експрес-тести призначені для якісного визначення специфічних антитіл до збудника сифілісу (антитрепонемних антитіл класу IgG) в цільній крові, сироватці або плазмі крові.

Цито-тест на сифіліс (Cito Test Syphilis)

Принцип тесту. Ці швидкі тести базуються на принципі взаємодії мікрочастинок, вкритих АГ *Treponema pallidum*, з імуноглобуліном людини класу IgG. Антитіла до IgG зафіксовані в районі тест-смуги Т на тест-касеті. Після додання у лунку S на касеті зразка крові (або плазми чи сироватки крові), останній реагує з мікрочастинками, вкритими АГ *Treponema pallidum*, на мембрані. Суміш хроматографічно просувається вздовж мембрани під дією капілярних сил, реагує з АТ класу IgG, що зафіксовані в районі смуги Т на тест-касеті. Якщо зразок містить в собі АТ до *Treponema pallidum*, то з'являється забарвлена смуга. Наявність чіткої забарвленої смуги в тестовій зоні свідчить про позитивну реакцію, в той час як її відсутність — про негативну реакцію. Як і в попередніх випадках, що ми вже описували для інших хроматографічних тестів, в якості вбудованої внутрішньої системи контролю, кольорова смуга завжди повинна з'являтися в зоні контролю С, тим самим підтверджуючи, що відбулося капілярне затікання.

Аналіз отриманих результатів:

- *тест позитивний* — поява двох чітких червоних смуг у зоні тесту Т та у зоні контролю С свідчить про наявність антитрепонемних АТ у досліджуваному зразку крові;
- *тест негативний* — поява однієї забарвленої смуги у зоні контролю С, яка свідчить про відсутність антитрепонемних АТ у досліджуваному зразку крові;
- *тест сумнівний* — відсутність смуги у зоні контролю С свідчить про зроблену процедурну помилку або про внесення недостатньої кількості реагентів. Аналіз треба повторити з новою тест-системою.

Обмеження до застосування імунохроматографічних експрес-тестів для виявлення сифілісу наступні.

- Експрес-тест для визначення сифілісу (цільна кров/плазма/сироватка) призначений для діагностики в умовах *in vitro*. Тест повинен використовуватися для визначення АТ ТР у клінічних зразках: цільна кров/плазма/сироватка крові. Він є якісним і тому не може визначати кількісний вміст ТР або рівень вмісту ТР.

- Даний тест тільки вказує на наявність АГ ТР у зразку і не повинен бути єдиним критерієм для визначення та постановки діагнозу інфекції, спричиненої ТР.
- Як і в усіх випадках діагностики, результати тесту повинні розглядатися у сукупності з усією клінічною інформацією.
- Отриманий негативний результат не виключає можливості присутності інфекції ТР.

Чутливість та специфічність є дуже важливими і основними показниками якості експрес-тестів, які завжди треба враховувати при виборі будь-якого тесту. Чутливість — це здатність виявляти мінімальну кількість того компоненту (АГ або АТ), для визначення якого і призначена тест-система. Низька чутливість обумовлює формування хибнонегативних результатів. Специфічність визначає здатність тест-системи диференційовано виявляти саме той компонент, для визначення якого і призначена тест-система. Низька специфічність призводить до отримання хибнопозитивних результатів. Загальновідомо, що чим вищі ці показники для тестів, тим якісніші ці тести. За результатами порівняння з показниками сероверсійної панелі та з показниками провідного тесту на сифіліс FTA-ABS чутливість одноступеневого експрес-тесту сягає 99,6%. Визначена специфічність складає 99,1%.

3.2. ХЛАМІДІОЗ

Урогенітальний хламідіоз (УХ) є одним із найпоширеніших захворювань, що передаються статевим шляхом. За даними ВООЗ у світі УХ хворіє близько 80 млн чоловік. Тільки США щорічно реєструється близько 5 млн нових випадків УХ, а в Європі — до 10 млн випадків на рік. В Російській Федерації спостерігається стійка тенденція до росту захворюваності на УХ, при цьому показник захворюваності складає 106,1 на 100 тис. населення.

Використання сучасних методів діагностики дозволяє виявити хламідійну інфекцію у кожної другої жінки з хронічними захворюваннями урогенітальної системи. Велику роль хламідійні інфекції відіграють в розвитку передракових захворювань шийки матки. У 50% жінок, що страждають безпліддям, причиною останнього є УХ. За даними світової літератури, при безплідних браках 50–55% чоловіків є стерильними, з них у 64% стерильність обумовлена хламідійною урогенітальною інфекцією.

Збудниками хламідійних інфекцій є грамнегативні бактерії, облигатні внутрішньоклітинні паразити з унікальним циклом розвитку, який включає дві різні за розміром, морфологічними ознаками і формою існування стадії: дрібні елементарні інфекційні тільця і великі ретикулярні неінфекційні внутрішньоклітинні. Цикл розвитку хламідій продовжується 48–72 годин. Протягом цього часу ретикулярні тільця перетворюються на елементарні, які вихо-

дять у зовнішнє середовище і заражають інші клітини. При деяких умовах хламідії можуть зупинити свій цикл розвитку і зберігатись у клітинах в неактивному стані, але є життєздатними, з утворенням так званих «атипічних» персистуючих форм, які при сприятливих умовах можуть знову реверсувати в інфекційні форми.

Рід хламідій об'єднує чотири види (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. pecorum*), з яких найбільше значення для людини мають перші два, вони ж мають один загальний антиген. Клінічні прояви хламідійних інфекцій різноманітні і залежать від вірулентності збудника, тривалості його перебування в організмі та напруженості загального і місцевого імунітету людини. Найчастіше виявляється УХ інфекція, що починається, як правило, розвитком первинного вогнища на слизовій оболонці цервікального каналу. З первинного вогнища збудник може розповсюджуватись по всіх відділах статевих шляхів жінки, викликаючи розвиток бартолініту, ендометриту, сальпінгіту, запалення органів малого тазу, тощо. Усі ці захворювання найчастіше мають безсимптомний (асимптоматичний) перебіг, який здебільшого характеризується незначним болем у низу живота, свербіжем зовнішніх статевих органів. Асимптоматичними є 70% ендцервікальних інфекцій у жінок і, що дуже важливо, етіологічний діагноз такого захворювання визначається тільки при лабораторному обстеженні.

Цито-тест на хламідії (Cito Test Chlamydia)

Діагностика хламідіозів докладно описана в численних методичних рекомендаціях. До вже представлених в цих матеріалах даних можна додати, що в останні роки широкого застосування набули високочутливі, але дуже дорогі методи, такі як ПЛР, лігазна ланцюгова реакція, сендвіч-гібридація та інші. Не втратили своєї актуальності методи світлової мікроскопії зішкрябних препаратів слизової оболонки кон'юнктиви, сечостатевих органів, пофарбованих за Романовським-Гімзою, та імунофлуоресцентної мікроскопії із застосуванням флуоресціюючих полі- і моноклональних сироваток. Певної популярності набув експрес-тест — ферментативна система для визначення *C. trachomatis* безпосередньо на тампоні (за зміною кольору). Проте особливу зацікавленість лікарі виявляють до швидких імунохроматографічних експрес-тестів для якісного визначення загального антигену *C. trachomatis* у мазках, зібраних у жінок з цервікального каналу, у мазках, зібраних з уретри у чоловіків та зразках чоловічої сечі з метою діагностики хламідійної інфекції.

При застосуванні цих тестів результат готовий вже через 10 хвилин.

Обмеження до застосування імунохроматографічних експрес-тестів для якісного визначення АГ *C. trachomatis*:

- Експрес-тест для визначення антигену хламідії (мазок/сеча) призначений для діагностики в умовах *in vitro*. Тест повинен використовуватися для визначення АГ хламідії у клінічних зразках. Він є якісним і тому не може визначати кількісний вміст хламідій або рівень вмісту АГ хламідії.
- Даний тест вказує на наявність АГ хламідії у зразку в життєспроможному або нежиттєспроможному стані.
- Кількість мікроорганізмів у зразку для дослідження впливає на визначення хламідії. Це обумовлено технічною стороною забору матеріалу (зразку) та такими факторами, як вік пацієнта, наявність в анамнезі захворювань, що передаються статевим шляхом, наявними симптомами, тощо. Як і в усіх випадках діагностики, результати тесту повинні розглядатися у сукупності з усією клінічною інформацією.
- Неможливо виявити ступінь ефективності проведеної антимікробної терапії, оскільки АГ може бути присутнім і після її проведення.

В роботі швидкі тести на хламідію (мазок/сеча) виявляють достатньо високу чутливість і специфічність — для зразків чоловічої сечі — 81,5 і 91,3% відповідно; для зразків, зібраних зондом з чоловічої уретри — 86,7 і 92,9% відповідно; для зразків, зібраних зондом із цервікального каналу — 93,3 і 97,7% відповідно.

Тлумачення результатів наступне.

- **Тест позитивний** — поява двох чітких червоних смуг у зоні тесту *T* та у зоні контролю *C* свідчить про наявність АГ хламідії у досліджуваному зразку крові;

УВАГА! Яскравість смуги в зоні (Т) може бути різною в залежності від концентрації АГ хламідії у досліджуваному зразку. Ось чому поява смуги будь-якого відтінку червоного в зоні (Т) має бути розцінена як позитивний результат.

- **Тест негативний** — поява однієї забарвленої смуги у зоні контролю *C* свідчать про відсутність АГ хламідії у досліджуваному зразку крові.
- **Тест сумнівний** — відсутність смуги у зоні контролю *C* свідчить про зроблену процедурну помилку або про внесення недостатньої кількості реагентів. Аналіз треба повторити з новою тест-системою.

3.3. ТУБЕРКУЛЬОЗ

Згідно зі світовою статистикою щороку в усьому світі від туберкульозу гине понад 2 млн людей — це більше, ніж за весь час історії людства (WHO, Fact Sheet N 104 Revised April, 2000). За оцінками ВООЗ в період між 2000 і 2020 роками майже 1 млрд осіб буде інфіковано, 200 млн захворіє та 35 млн загине від туберкульозу, якщо контроль за епідемією не буде посилено. Сьогодні в Україні понад 125 тис. хворих активною формою туберкульозу. Щорічно понад 12 тис. українських громадян помирають від цієї хвороби, що складає

більше 30 чоловік на день. В 2003 році рівень захворюваності на туберкульоз становив 77,5 на 100 тис. населення, а рівень смертності — 21,8 на 100 тис. В 2004 році відзначається 11-та річниця від того часу, коли ВООЗ проголосила туберкульоз глобальною небезпекою.

Збудником туберкульозу є патогенні мікобактерії роду *Mycobacterium* родини *Mycobacteriaceae*. Цей рід об'єднує понад 30 видів мікобактерій, але туберкульоз у людини спричиняють лише 2 — *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis*. Найбільше епідемічне значення має людський вид — мікобактерія туберкульозу (МБТ). Встановлено, що 95–98% штамів, які виявляють у хворих на туберкульоз органів дихання, припадає на цей вид. Крім безумовно патогенних для людини МБТ, певну роль у виникненні захворювань, що за клінічним перебігом нагадують туберкульоз, відіграють умовно-патогенні атипові мікобактерії. Вони спричиняють мікобактеріози, які на окремих територіях становлять 3% захворювань, зумовлених мікобактеріями, головним чином позалегеневої локалізації.

Діагноз туберкульозу встановлюють на підставі результатів клінічного, рентгенологічного обстеження, а також лабораторного дослідження. Є такі лабораторні методи, що дають змогу отримати безпосереднє підтвердження інфекції. До них належать бактеріологічні (бактеріоскопія, різні способи флотації, культуральні методи із застосуванням спеціальних середовищ), морфологічні та деякі інші. В сучасну лабораторну діагностику туберкульозу залучаються і такі нові методи, як ІФА, ПЛР, радіометричний метод ВАСТЕС, молекулярно-біологічні дослідження рестрикційних фрагментів ДНК мікобактерій тощо. Останні вимагають використання лабораторій із найсучаснішим дуже дорогим обладнанням і тест-системами, а також висококваліфікованих співробітників, здатних якісно та правильно проводити такі дослідження.

Діагностика туберкульозу різних форм має свою особливість. Треба враховувати також, що при низькій чутливості бактеріологічних методів, наприклад, бактеріоскопії (30–80%) та тривалості до кількох тижнів культурального методу, при вкрай високих затратах на молекулярно-біологічні методи, актуальним стає розробка та впровадження в практику дешевих методів індикації МБТ та серодіагностики туберкульозу.

Швидкі імунохроматографічні тести для виявлення специфічних антитіл до антигенів *Mycobacterium tuberculosis* призначені для дослідження сироватки крові, плазми та цільної крові. Вони зареєстровані в Україні, прості у виконанні і доступні. Швидкі ІХА-тести для серодіагностики виявляють специфічні антитіла класів IgG та IgA до МБТ. У випадку високих концентрацій в крові виявляються також IgM. При цьому, дуже важливо підкреслити, що зразки,

отримані від вакцинованих БЦЖ осіб, не виявляються цим тестом.

Швидкі тести є безумовно корисними в діагностиці активного туберкульозу.

Цито-тести на туберкульоз

Принцип тесту. Виявлення антитіл до протеїнів МБТ — базується на застосуванні в ІХА-аналізі імунологічної взаємодії синтетичних антигенів МБТ, що жорстко іммобілізовані на нітроцелюлозній мембрані, з комплексом анти-МБТ з анти-людським IgG, кон'югованим з КЗ. Хроматографічна мембрана для визначення анти-МБТ має у своїй стромі наступні компоненти: у зоні внесення досліджуваного зразка крові (або сироватки крові, або плазми) на ній нанесені анти-людський IgG, кон'югований з барвником — колоїдним золотом (КЗ). На ній же мембрані в зоні Т (тест) жорстко фіксовані у вигляді смуги (до аналізу безбарвної на вигляд) антигени МБТ, та далі на мембрані — зона С (контроль).

Після внесення досліджуваного зразка крові, плазми або сироватки крові, відбувається дифузія анти-МБТ (при наявності в зразку) та анти-людських імуноглобулінів, мічених барвником. Протягом дифузії вони взаємодіють один з одним, утворюючи імунні комплекси, хроматографічно просовуються далі уздовж мембрани, досягають місця розташування протеїнів МБТ на мембрані і знову імунологічно взаємодіють з останніми, що призводить до формування специфічних імунних комплексів і накопичування барвника. В зоні Т з'являється чітка смуга червоного кольору. Подальша дифузія вищезгаданих імунних комплексів або, при відсутності анти-МБТ у зразку, кон'югату з КЗ до зони контролю С призводить до імунологічної взаємодії їх з утворенням контрольної червоної смуги, яка є свідченням правильно проведеного аналізу досліджуваного зразка.

Тлумачення результатів здійснюють згідно з інструкцією, отримуючи відповідно *позитивний* (дві кольорові смуги в зонах Т і С), *негативний* (одна кольорова смуга в зоні С) або *сумнівний* результат (жодної кольорової смуги на касеті тесту).

3.4. ГОНОРЕЯ

Гонорея поширена в усьому світі. У нашій країні останнім часом захворюваність на гонорею має незначну тенденцію до зниження, але в окремих областях щорічно кількість хворих зростає. Особливу увагу привертає поширення гонореї серед дітей та підлітків. Гонорея спричиняється гонококом — парним коком, відкритим у 1879 році А. Нейсером. З метою раннього і повного виявлення хворих для діагностики гонореї матеріал забирається з осередків можливого ураження (сечовивідного каналу, прямої кишки, каналу шийки матки). Як правило використовуються хоча б один метод дослідження: бактеріоскопічний, бактеріоло-

гічний, МФА, імунохімічний, серологічний або алергійний тест. Лабораторне обстеження доцільно організовувати не тільки в кабінетах дерматовенерологічного диспансеру, а й у базових жіночих консультаціях, оглядових кабінетах лікарень і амбулаторій державної та недержавної форм власності.

Як відбірковий тест під час обстеження великих груп населення, що підлягають обов'язковому медичному обстеженню на венеричні хвороби, та пацієнтів із хронічними запальними процесами сечових і статевих органів нез'ясованої етіології, а також і для поодиноких досліджень рекомендується застосовувати швидкий касетний тест для виявлення гонореї Cito Test Gonorrhoea.

Цито-тест для виявлення гонореї (Cito Test Gonorrhoea)

Принцип тесту. Одностадійний касетний тест для діагностики гонореї є швидким і дозволяє візуально виявити антиген збудника в досліджуваних зразках. В тесті задіяно принцип імунного аналізу і застосовуються як моноклональні, так і поліклональні АТ. Чутливість та специфічність тесту значно перевищують відповідні бактеріологічні методи дослідження. Вживання будь-яких лікарських засобів не впливає на результат тесту, який здатний виявити як мінімум 1×10^5 бактерій/мл. Тривалість тесту 10–20 хвилин.

УВАГА! Не проводити облік результатів через 30 хвилин!

Тлумачення результатів здійснювати у повній відповідності до інструкції:

- **тест негативний** — тільки одна смуга в зоні контролю (С);
- **тест позитивний** — по одній рожевій смузі в зонах контролю (С) і тесту (Т);
- **тест сумнівний** — відсутність смуги у зоні контролю С.

Попередження:

- призначений тільки для діагностики в умовах *in vitro*;
- при роботі із зразками застосовувати латексні або гумові рукавички;
- дотримуватися терміну придатності тесту;
- не використовувати двічі.

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Наказ МОЗ України №120 від 25.05.2000 р. «Про вдосконалення організації медичної допомоги хворим на ВІЛ-інфекцію/СНІД».
2. Змушко Е.И., Белозеров Е.С. (2000) ВІС-инфекция: Руководство для врачей. Питер, СПб., 320 с.
3. Навчальний посібник з лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції/СНІДу: Навчально-методичний посібник для лікарів (1999). Київ, 156 с.
4. Рахманова А.Г., Воронин Е.Е., Фомин Ю.А. (2003) ВІС-инфекция у детей. СПб., 131 с.
5. Трубіна Л.М., Тишечкіна В.А., Малікова М.В., Кольцова І.Г. та ін. (1997) Клініка, діагностика та лікування перинатальних захворювань з групи TORCH: Методичні рекомендації. Одеса, 24 с.
6. Трубіна Л.М., Кольцова І.Г., Тишечкіна В.А. та ін. (1998) TORCH-інфекції у вагітних: Методичні рекомендації. Одеса, 22 с.
7. Европейские стандарты диагностики и лечения заболеваний, передаваемых половым путем (2003). Медицинская литература, Москва.
8. Clinical Management of the HIV-infected Adult. A manual for midlevel clinicians. Originally published September 1993, revised March 2003.
9. Guidelines for Performing Single-Platform Absolute CD4+ T-Cell Determinations with CD 45 Gating for Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus. Recommendation and Reports: January 31, 2003.
10. Sanders J.W. et al. (1994) Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urine of Asymptomatic Men. J. Clin. Microbiology, 32: 24–27.
11. Jaschek G. et al. (1993) Direct Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urine Specimens from Symptomatic and Asymptomatic Men by Using a Rapid Polymerase Chain Reaction Assay. J. Clin. Microbiology, 31: 1209–1212.
12. Schachter J. (1982) Sexually transmitted *Chlamydia trachomatis* infection. Postgraduate Medicine, 72: 60–69.
13. Claire M. (1998) Fraser. Complete genome sequence of *Treponema Pallidum*, the syphilis spirochete. Science, 281 (July): 375–381.
14. Center for Diseases Control. Recommendations for diagnosing and treating syphilis in HIV-infected patients. MMWR Morb. Mort. Wkly Rep. (1988) 37: 601.
15. Johnson Phillip C. (1994) Testing for Syphilis. Dermato-logic Clinic, 12 (Jan): 9–17.