

**Лабораторная  
диагностика инфекционных  
болезней: современные  
требования**

**Творогова Мария Глебовна**



# Общие принципы лабораторной диагностики инфекционных болезней

- **Прямые методы лабораторной диагностики инфекционных болезней** – обнаружение в биологических материалах пациента микроорганизма или его специфических фрагментов
  - визуальное обнаружение микроорганизма (**микроскопия**)
  - изоляция микроорганизма в культуре клеток или на специальных средах (**культуральные исследования, посев**)
  - выявление специфических белков-антигенов (**АГ**) (**иммунологические/иммунохимические**)
  - выявление фрагментов нуклеиновых кислот возбудителя (методы амплификации нуклеиновых кислот, **МАНК**)
- **Косвенные (непрямые) методы лабораторной диагностики инфекционных болезней** - обнаружение в биологических жидкостях пациента специфических антител (**АТ**) (**иммунологические/иммунохимические**) к соответствующему возбудителю



# Структура вириона коронавируса

Молекулярная диагностика инфекционных болезней, 2018

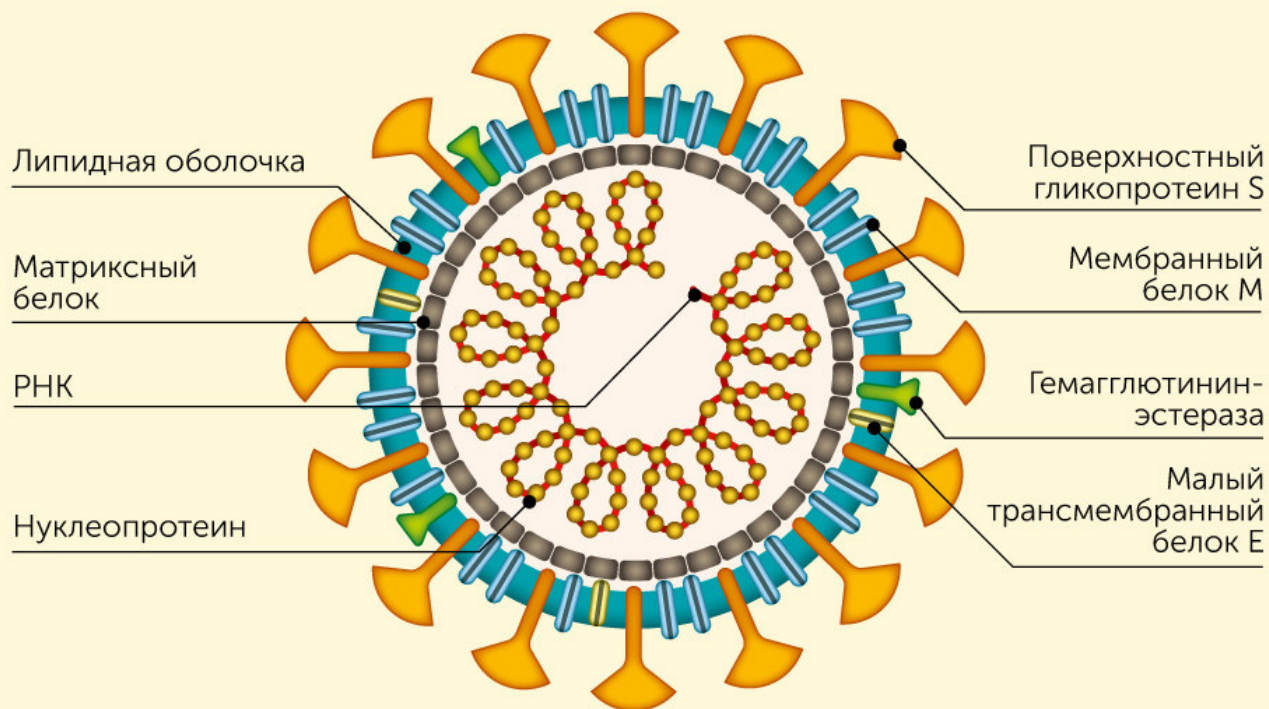


рисунок 31



# Основные термины клинической лабораторной диагностики

- **Антигены** — вещества (преимущественно белки), присутствие которых вызывает иммунную реакцию организма – образование антител
- **Антитела** - белки глобулиновой фракции биологических жидкостей (сыворотка крови, спинномозговая, синовиальная и др.), образующиеся в организме в ответ на проникновение белков бактерий, вирусов, белковых токсинов и других антигенов

**АТ-IgA** специфические антитела, иммуноглобулины класса А

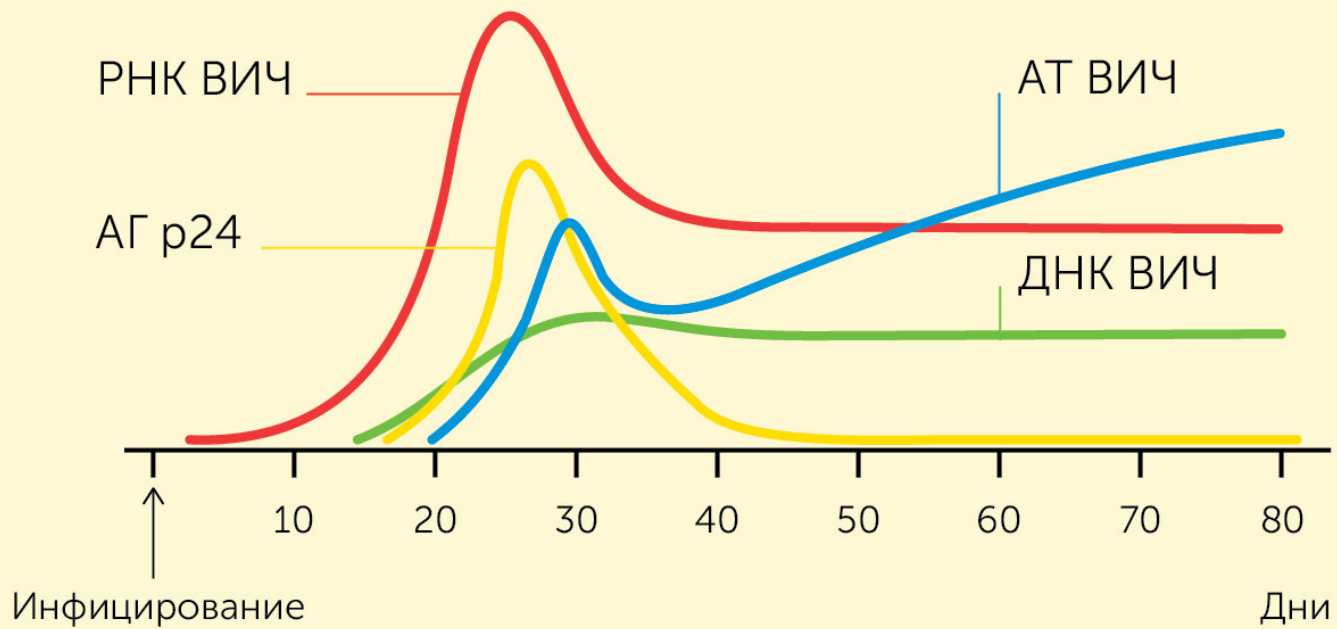
**АТ-IgG** специфические антитела, иммуноглобулины класса G

**АТ-IgM** специфические антитела, иммуноглобулины класса M



# Динамика появления лабораторных маркеров ВИЧ-инфекции в плазме крови

Лабораторная диагностика инфекционных болезней, 2013/2020

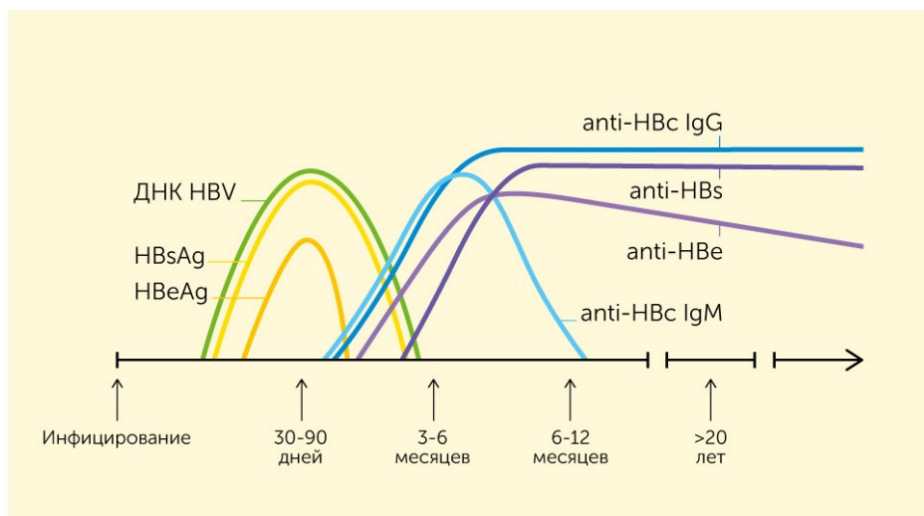




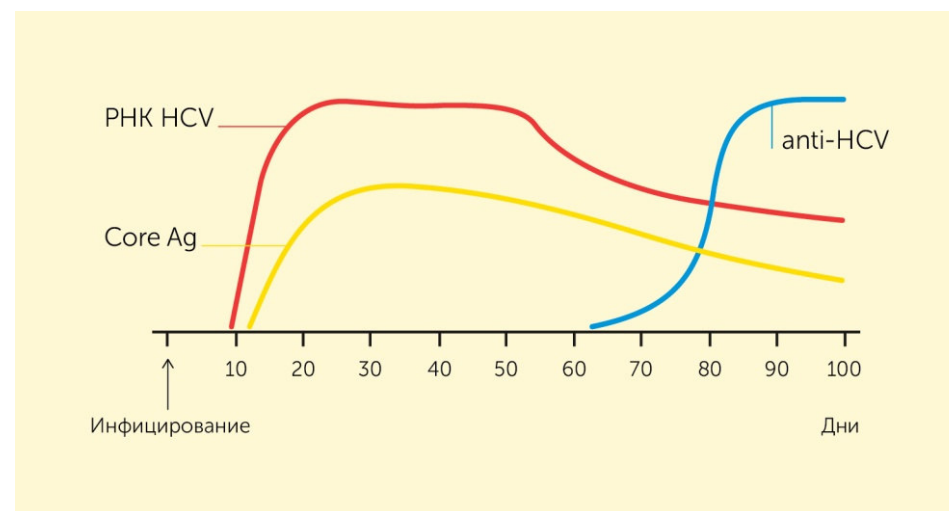
# Динамика появления лабораторных маркеров вирусов гепатитов В и С и вирусных гепатитов В и С в плазме крови

Лабораторная диагностика инфекционных болезней, 2013/2020

## ■ Лабораторные показатели у больных ВГВ



## ■ Лабораторные показатели у больных ВГС

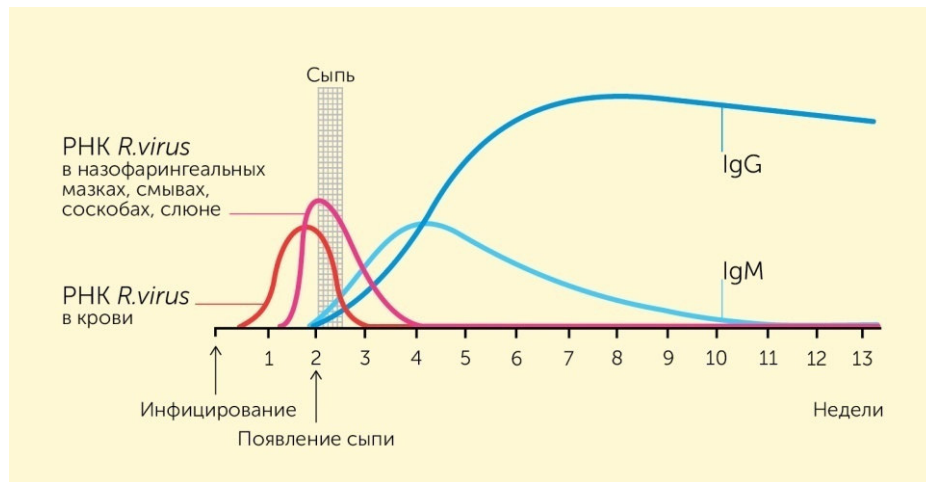




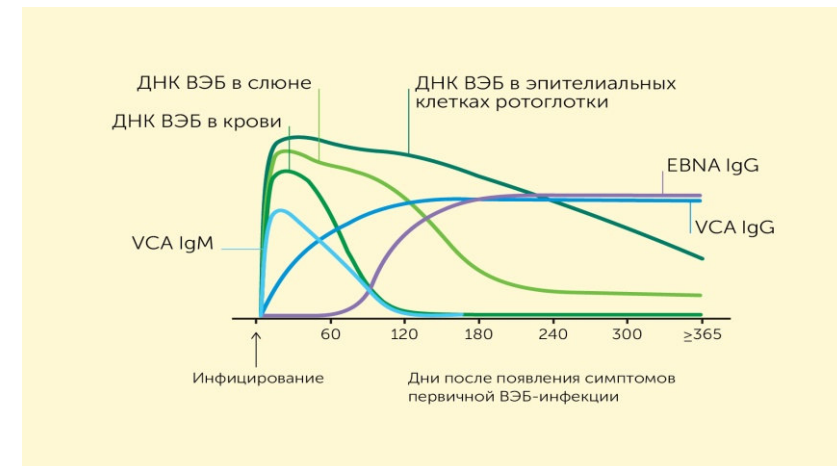
# Динамика лабораторных маркеров ToРСН-инфекций и их возбудителей в биологических материалах

Лабораторная диагностика инфекционных болезней, 2013/2020

- **Лабораторные показатели у больных краснухой**



- **Лабораторные показатели у больных парвовирусной инфекцией**





# Основные термины клинической лабораторной диагностики

- **Клиническая (диагностическая) специфичность** лабораторного теста: доля истинно отрицательных результатов среди здоровых лиц в группе обследуемых
  - **Истинноотрицательные/Все обследованные**
  
- **Клиническая (диагностическая) чувствительность** лабораторного теста: доля истинно положительных результатов среди всех проведенных тестов у заболевших обследуемой группы
  - **Истинноположительные/Все обследованные**





# Правила проведения лабораторных исследований

ПРИКАЗ МЗ РФ от 18 мая 2021 года N 464н  
(с изменениями на 23 ноября 2021 года)

- Клинические лабораторные исследования включают в себя следующие виды: химико-микроскопические, гематологические, цитологические, биохимические, коагулологические, иммунологические, молекулярно-генетические, химико-токсикологические
- Клинические лабораторные исследования проводятся с использованием следующих технологий: микроскопических, химических, биохимических, иммунологических, молекулярно-генетических, хроматографических, масс-спектрометрических
- ~~серологические исследования~~



# Основные термины клинической лабораторной диагностики

- **Биологический материал – образцы биологических жидкостей и тканей человека**
- **Аналит – компонент или характеристика образца биоматериала которые необходимо определить**



# Тест

- **Название теста (аналит + биоматериал)**
  - ❖ **Аденовирус ДНК, обнаружение в бронхо-альвеолярной лаважной жидкости**
  - ❖ **Аденовирус ДНК, обнаружение в спинномозговой жидкости**
  - ❖ **Аденовирус ДНК, обнаружение в мазках со слизистой оболочки носоглотки и ротоглотки**



# Тест

- **Название теста (аналит + биоматериал)**
  - ❖ **Определение концентрации ДНК ВГВ в крови**
  - ❖ **Обнаружение ДНК ВГВ в крови**
  - ❖ **Обнаружение ДНК цитомегаловируса в СМЖ**



# Набор реагентов (реактивов)

- ❑ **Набор реактивов (kit)** Совокупность компонентов, которые упакованы вместе и предназначены для выполнения специфического исследования диагностики *in vitro* ГОСТ Р ИСО 18113-2015
- ❑ **Набор реагентов (реактивов)** Комплект специально подобранных реагентов (реактивов), составных частей и инструкций по проведению анализа, предназначенный для определения *in vitro* одного конкретного вещества, возбuditеля (или активности фермента), нескольких конкретных веществ, возбuditелей (или суммарной активности ферментов), а также для детекции участка генома ГОСТ Р 51088-2013
- ❑ **Тест-система (набор реагентов)** Термин, применяемый в литературе и нормативных документах преимущественно для определения медицинского изделия, используемого в иммунохимических исследованиях ГОСТ Р 51088-2013



# Набор реагентов (реактивов) коммерческий?

## ■ Commercial kit

- Набор реагентов серийного изготовления

Commercial:

1. коммерческий, торговый;
  2. промышленный;
  3. доходный, прибыльный, выгодный, рентабельный;
  4. серийный;
  5. технический (в отличие от химически чистого материала)
- commercial test – заводские испытания*

## ■ Laboratory

**developed tests**

**(LDT), in-house test**

- Тесты, разработанные лабораторией



# Регистрация медицинских изделий

- **Регистрация медицинских изделий** – государственная процедура, цель которой разрешить выпуск на российский рынок качественных и безопасных изделий
- Частью 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» установлено, что на территории Российской Федерации **разрешается обращение медицинских изделий, зарегистрированных в порядке, установленном Правительством Российской Федерации**, уполномоченным им федеральным органом исполнительной власти.
- Федеральный закон от 31.12.2014 г. № 532-ФЗ О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации **в части противодействия обороту** фальсифицированных, контрафактных, недоброкачественных и **незарегистрированных** лекарственных средств, **медицинских изделий** и фальсифицированных биологически активных добавок



# Молекулярно-биологические исследования. Методы

- **Методы амплификации нуклеиновых кислот** (МАНК) - группа методов для обнаружения или определения концентрации ДНК/РНК микроорганизмов и выявления мутаций, основаны на амплификации нуклеиновых кислот
- **MALDI-TOF MS** (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация - метод идентификации микроорганизмов до рода и вида с помощью времяпролетного масс-спектрометра с матричной ионизацией





# Полимеразная цепная реакция (ПЦР, polymerase chain reaction, PCR)

**Полимеразная цепная реакция** (*ПЦР, polymerase chain reaction, PCR*) метод амплификации нуклеиновых кислот с использованием фермента термостабильной ДНК-зависимой ДНК-полимеразы

▣ Способы детекции продуктов амплификации

➤ электрофорез

➤ в присутствии флуоресцентно-меченых зондов с детекцией сигнала в процессе реакции (РТ-ПЦР, Real-Time PCR)

➤ в присутствии флуоресцентно-меченых зондов с детекцией сигнала после окончания реакции (fluorescence detection with end point analysis, FEP)

■ ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

■ Мультиплексная ПЦР



# Методы амплификации нуклеиновых кислот

Молекулярная диагностика инфекционных болезней, 2018

- **NASBA** (Nucleic Acids Sequence-Based Amplification) и **TMA** (Transcription Mediated Amplification) – методы специфической амплификации рибосомальной РНК в изотермических условиях
- **bDNA** (branched chain DNA) - метод разветвленной ДНК, основан на амплификации сигнала гибридизации исследуемой нуклеиновой кислоты с синтетической разветвленной детектирующей молекулой ДНК
- **HDA** (Helicase-Dependent Amplification) - изотермический метод амплификации нуклеиновых кислот с использованием фермента хеликазы
- **LAMP** (LOOP-mediated amplification, петлевая изотермическая амплификация) – метод включает синтез цепи ДНК с помощью ДНК-зависимой ДНК-полимеразы при условии наличия в реакционной смеси двух пар специфических олигонуклеотидных праймеров, комплементарных искомой мишени
- **Digital PCR** (цифровая) - количественная ПЦР с регистрацией результата амплификации по конечной точке. Не требует калибровки и использования стандартов амплификации



# Методы амплификации нуклеиновых кислот

Молекулярная диагностика инфекционных болезней, 2018

- **nested PCR** (гнездовая, вложенная ПЦР) - вариант ПЦР с использованием двух пар праймеров, вторая из которых амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции
- **RCA** (Rolling Circle Replication, амплификация по типу катящегося кольца) - метод изотермической амплификации нуклеиновых кислот, осуществляемой на кольцевых ковалентно замкнутых молекулах ДНК по типу катящегося кольца
- **RPA** (Recombinase-Polymerase-Amplification, амплификация с помощью полимеразы, опосредованная рекомбиназой) – метод изотермической амплификации нуклеиновых кислот с использованием ферментов полимеразы и рекомбиназы
- **SDA** (Strand Displacement Amplification, метод амплификации с вытеснением цепи) – изотермический метод амплификации нуклеиновых кислот с использованием ДНК-зависимой ДНК-полимеразы с высокой вытесняющей активностью и дополнительных ферментов (никазы или эндонуклеазы)



# Методы амплификации нуклеиновых кислот

- **Качественные** (неколичественные): результаты выражены в номинальной или в двоичной шкале (наличие или отсутствие) искомого компонента биоматериала или патологического агента
- **Количественные** - определение концентрации/активности анализируемого вещества в образце биоматериала; результат выражается в виде числового значения, выраженного в определенных единицах

**Единицы измерения:** копий/мл, геном-экв/мл, МЕ/л,  
Ig копий/ $10^5$  клеток



# Иммунологические исследования. Методы

- **Иммунологические** – качественная, полуколичественная, количественная оценка содержания аналитов с использованием реакции антиген/антитело
- **Иммунохимические** - обнаружение/определение концентрации аналита с использованием реакции антиген/антитело, в которых антиген или антитело маркированы веществом, генерирующим сигнал, измеряемый для детекции образованного комплекса антиген/антитело
- ~~**Серологические методы**~~



# Иммунологические исследования. Методы

## Определение АГ

### ■ ИФА

(иммуноферментный анализ)

### ■ ИХЛА

(иммунохемилюминесцентный анализ)

### ■ Иммунохроматография

### ■ Реакция (прямой) иммунофлуоресценции

### ■ Радиальная иммунодиффузия

## Определение АТ

### ■ ИФА

(иммуноферментный анализ)

### ■ ИХЛА

(иммунохемилюминесцентный анализ)

### ■ Иммунохроматография

### ■ Реакция (непрямой) иммунофлуоресценции

### ~~Серологические методы~~



# Иммунохимические исследования. Методы

- **Качественные** (неколичественные): результаты выражены в номинальной или в двоичной шкале (наличие или отсутствие) искомого компонента биоматериала или патологического агента
- **Полуколичественные**: результаты выражены в ординальной (порядковой) шкале, значения могут быть выражены фразами, числами, символами (< или >)
- **Количественные**: определение концентрации/активности анализируемого вещества в образце биоматериала; результат выражается в виде числового значения, выраженного в определенных единицах ВАУ/мл, МЕ/мл Ед/мл.



# Основные термины клинической лабораторной диагностики

- **Метод** - описание основной (физической, химической, ферментативной) реакции для определения аналита и способа регистрации ее результатов
- **Методика** – описание метода (алгоритм, процедура, технология) для определения характеристики аналита





# Основные термины клинической лабораторной диагностики

## ■ Аналитическая специфичность метода (методики)

способность обнаружения/определения только определенного аналита, оценивается по степени влияния различных примесей или матрицы биоматериала на результат анализа

## ■ Аналитическая чувствительность метода (методики)

наименьшее количество вещества, которое можно обнаружить этим методом (методикой)



# ГОСТ Р ИСО 15189-2015 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности

- **Три этапа лабораторных исследований**
  - **Преаналитический**
  - **Аналитический**
  - **Постаналитический**



# Лабораторная диагностика инфекционных болезней. Особенности преаналитического этапа

## ■ Долабораторный

### ■ Назначение исследования - выбор теста

✓ Выбор анализа (АГ, НК, АТ)

✓ Выбор биоматериала (кровь, моча, СМЖ, слюна, мазки/соскобы со слизистых оболочек разных органов и других локализаций, биоптаты)

### ■ Взятие биоматериала

### ■ Хранение и доставка в лабораторию

## ■ Лабораторный

### ■ Прием и регистрация биоматериала

### ■ Хранение биоматериала

### ■ Подготовка к исследованию



# Аналитический этап лабораторных исследований

- Подготовка образца к исследованию (инструкция к выбранному набору реагентов)
- Проведение исследования – (методика в соответствии с выбранным набором реагентов)
- Оценка результата (контроль качества исследования)



# Основные термины клинической лабораторной диагностики

- **Стандартный образец; (reference material):** Материал, достаточно однородный и стабильный по отношению к одному или нескольким определенным свойствам, которые были установлены для того, чтобы использовать его по назначению в измерительном процессе  
**ГОСТ Р ИСО 17822-2021**



# Стандарты ВОЗ

- РНК ВГС
- ДНК ВГВ
- РНК ВИЧ
- РНК ВГD
- РНК ВГЕ
- ДНК ВЭБ
- ДНК ЦМВ

В 1997 г. комитет экспертов ВОЗ по биологической стандартизации изготовил "международный стандартный образец" РНК ВГС (лиофилизированная сыворотка крови, содержащая РНК ВГС 1-го генотипа), концентрация которой выражена в международных единицах (IU/mL, МЕ/мл). Специальные коэффициенты позволяют пересчитывать полученные показатели концентрации в международные единицы



# Контроль качества лабораторных исследований

- **ГОСТ Р 53133.2-2008**
- **Комплексную систему контроля качества клинических лабораторных исследований осуществляют путем:**
  - ✓ **ежесерийного выполнения процедур внутрилабораторного контроля качества с использованием контрольных материалов (оперативный контроль качества);**
  - ✓ **регулярного участия в программах внешней оценки качества.**



# Основные термины клинической лабораторной диагностики

- **Контрольный материал:** однородный материал человеческого или животного происхождения или искусственный материал, насколько это возможно приближающийся по своим наиболее существенным свойствам к исследуемому биологическому материалу пробы и предназначенный для оценки качества исследований проб пациентов, выполняемых в клинико-диагностических лабораториях медицинских организаций **ГОСТ Р 53133.3-2008**





## Внутрилабораторный контроль качества выявления ДНК/РНК

- контроль эффективности выделения и амплификации ДНК/РНК - внутренний контрольный образец (ВКО), рекомбинантный препарат ДНК/РНК с известной концентрацией
- контроль возможной контаминации - отрицательный контрольный образец



# ВНЕШНЯЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА - РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ ПОСЛЕ ИХ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

**Межлабораторное сравнение** - организация, выполнение и оценка измерений/тестов в двух или более лабораториях в соответствии установленными условиями, выполняется профессиональным провайдером (ILAC<sup>2</sup>-G13:2000) или организатором (IFCC/EMD/C-A-Q)

**Внешний контроль качества (EQA)** Европа, Центральная и Южная Америка (EN<sup>1</sup> 14136:2004)

**Профессиональное тестирование (proficiency testing)**  
Северная Америка (ISO/IEC Guide 43:1997)

<sup>1</sup>Европейский стандарт

<sup>2</sup> International Laboratory Accreditation Cooperation



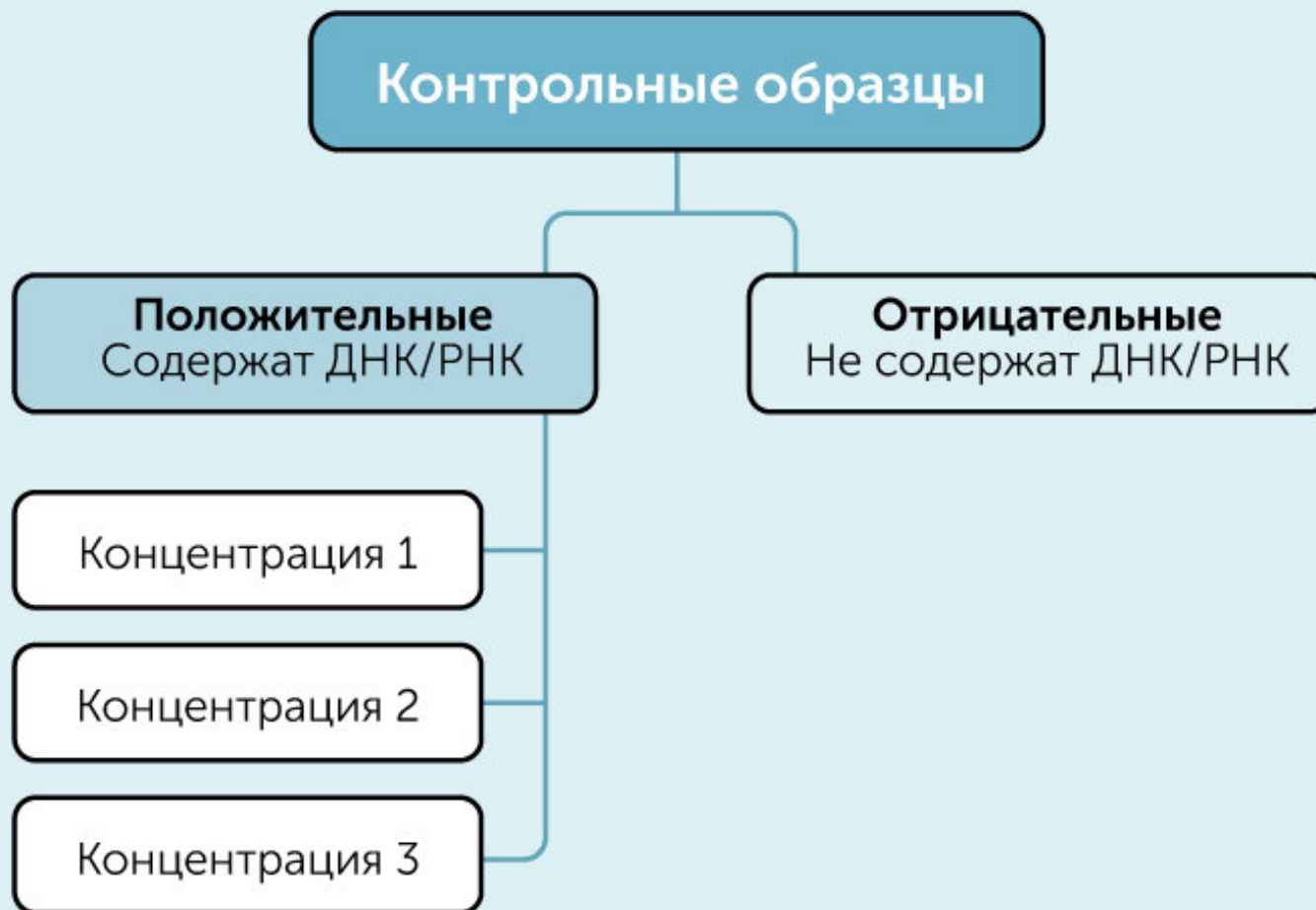
# Межлабораторные сравнительные (сличительные) испытания

ГОСТ ISO/IEC 17043-2013    ГОСТ EN 14136-2016

- Провайдер (проверок квалификации): Юридическое лицо, осуществляющее деятельность по разработке и проведению программ проверки квалификации испытательных лабораторий посредством межлабораторных сравнительных испытаний.
- В России функционирует онлайн-платформа национальной системы аккредитации «Программы проверки квалификации лабораторий», которая содержит актуальные сведения обо всех программах МСИ, проводимых провайдерами, аккредитованными на соответствие ГОСТ ISO/IEC 17043-2013 «Оценка квалификации соответствия. Основные требования к проведению проверки».



# Состав панели контрольных образцов для оценки обнаружения/определения концентрации нуклеиновых кислот





# Параметры, контролируемые в ходе внешней оценки качества молекулярно-биологических исследований

## ■ Контрольные образцы (survey sample):

Образцы, направляемые участникам для выполнения определенного вида исследования, результаты которого возвращаются организатору СВОК для независимой оценки качества

## ■ Качественные исследования

- ❖ Чувствительность
- ❖ Специфичность

## ■ Количественные исследования

- ❖ Правильность
- ❖ Воспроизводимость



# Лабораторная диагностика инфекционных болезней. Особенности постаналитического этапа

## ■ Внутрелабораторная фаза

- Сопоставление с ранее проведенными аналогичными исследованиями или параллельно проведенными другими исследованиями
- Внутрелабораторный контроль качества

## ■ Внелабораторная фаза

- Оценка клинической значимости информации о состоянии полученной в результате лабораторного исследования
- Сопоставление с клиническими данными пациента
- Сопоставление с результатами других видов объективных исследований, в том числе лабораторных



# Принцип лабораторной диагностики инфекционных болезней

- **Выбрать анализ и биоматериал (лабораторный тест) в соответствии со стадией болезни, учитывая данные о клинической чувствительности и специфичности**
- **Выбрать метод исследования анализа, учитывая данные о клинической чувствительности и специфичности**
- **Выбрать методику определения анализа, учитывая данные об аналитической чувствительности и специфичности**



# Лабораторная диагностика инфекционных болезней: современные требования

**Спасибо за внимание!**