

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«МОСКОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ им. Г.Н.ГАБРИЧЕВСКОГО»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Смердова Марина Анатольевна

**ОСОБЕННОСТИ КОЛЛЕКТИВНОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСАМ
КОРИ И КРАСНУХИ; КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ
Доктор медицинских наук,
Топтыгина Анна Павловна

Москва 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	4
Введение.....	6
Глава 1 Обзор литературы.....	17
1.1. Современная ситуация по кори и краснухе в мире и в Российской Федерации...	17
1.1.1 Коревая инфекция. Ситуация по кори в мире и России.....	17
1.1.2 Краснушная инфекция. Ситуация по краснухи в мире и России	21
1.1.3 Стратегический план Всемирной организации здравоохранения по элиминации кори и краснухи к 2020 году.....	24
1.2. Вирусы кори и краснухи. Маркеры коревой и краснушной инфекций.....	27
1.2.1 Серологические маркеры коревой и краснушной инфекций. Методы определения .	27
1.2.2 Популяционный иммунитет. Успехи и проблемы.....	32
1.3 Контроль качества результатов лабораторных исследований	35
1.3.1 Нормативная база контроля качества результатов исследований в мире и в Российской Федерации.....	35
1.3.2 Внешняя оценка качества и внутрилабораторный контроль качества исследований.....	38
1.3.3 Опыт проведения внешней оценки качества и внутрилабораторного контроля качества	40
Глава 2 Материалы и методы исследования.....	45
2.1.Материал исследования.....	45
2.1.1 Сбор и обработка проб крови.....	48
2.2. Вакцины и препараты.....	48
2.2.1 Вакцина.....	48
2.2.2 Контрольные материалы.....	49
2.3.Методы исследования.....	51
2.3.1 Определение количества специфических иммуноглобулинов классов М, G.....	51
2.3.2 Проведение внутрилабораторного контроля качества скрининговых исследований	55
2.3.3 Определение специфических IgA и субклассов специфических IgG	55
2.3.4 Определение авидности специфических антител	56
2.3.5 Методы математической обработки полученных результатов	59
Результаты исследований.....	63
Глава 3 Исследование гуморального иммунитета к вирусам кори и краснухи.....	63
3.1.Влияние особенностей коллективного иммунитета к антигенам вирусов кори и краснухи на структуру заболеваемости	63
3.2. Гуморальный иммунитет к антигенам вирусов кори и краснухи у здоровых людей в возрасте 18-30 лет	71

3.3. Формирование гуморального иммунитета на коревую вакцину у взрослых	74
3.4. Сопоставление гуморального иммунного ответа у взрослых больных корью и привитых от этой инфекции	77
Глава 4 Проведение внутрилабораторного контроля качества при определении антител класса G к вирусам кори и краснухи методом иммуноферментного анализа с помощью контрольных препаратов.....	83
4.1. Проведение внутрилабораторного контроля качества при определении IgG-антител к вирусам кори методом иммуноферментного анализа.....	83
4.1.1 Подбор и определение рабочей концентрации «ВЛК Корь-IgG».....	84
4.1.2 Определение некоторых параметров вариационной статистики при исследовании препаратов ВЛК ₁ и ВЛК ₂	86
4.1.3 Проведение внутрилабораторного контроля качества.....	89
4.2. Проведение внутрилабораторного контроля качества при определении IgG-антител к вирусам краснухи методом иммуноферментного анализа	93
4.2.1 Подбор и определение концентрации препарата «ВЛК Рубелла-IgG».....	93
4.2.2 Определение некоторых параметров вариационной статистики тестирования «ВЛК Рубелла-IgG».....	96
4.2.3 Проведение внутрилабораторного контроля качества с помощью «ВЛК Рубелла-IgG».....	97
Глава 5 Обсуждение.....	102
5.1. Особенности гуморального иммунитета к вирусам кори и краснухи	102
5.2.Внутрилабораторный контроль качества при определении IgG-антител к вирусам кори и краснухи методом иммуноферментного анализа	110
5.3.Алгоритм проведения внутрилабораторного контроля качества при определении IgG-антител к вирусам кори и краснухи методом иммуноферментного анализа	115
Выводы.....	121
Рекомендации и перспективы.....	123
Список литературы.....	125

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

анти-HBs - антитела к вирусу гепатита В

ВКК - внутрилабораторного контроля качества

ВЛК - препарата для внутрилабораторного контроля

ВОЗ - Всемирной Организации Здравоохранения

ВОК - внешней оценки качества

ЕКС - Европейский комитет по стандартизации

ЕРБ ВОЗ – Европейское региональное бюро ВОЗ

ИФА - Иммуноферментный анализ

КДЛ - клинико-диагностическая лаборатория

КК - контроль качества

КО - контрольный образец

КП - коэффициент позитивности

КТ - Конечная точка

МЕ - Международные единицы

о.е. - оптические единицы

ОДС - отрицательная донорская сыворотка

ОП - Оптическая плотность

ОП крит. – критическое значение оптической плотности

ПЦР- полимеразная цепная реакция

РНК- рибонуклеиновая кислота

СЕ-Директивы Европейского союза отмечается нанесением на товарную продукцию

СВК - синдром врожденной краснухи

СОП - стандартные операционные процедуры

ТМБ -Тетраметилбензидин.

ФСВОК - Федеральная система внешней оценки качества

CLSI- Институт клинических и лабораторных стандартов

Cutoff - Пороговый критерий

CV - коэффициент вариации

ECDC - Европейский центр профилактики и контроля заболеваний

EFS - Службы крови Франции

EVAP - Европейский план действий по вакцинации на 2015-2020 годы

FDA - Агентство пищевых продуктов и лекарств

IgA - Иммуноглобулин класса А

IgG - Иммуноглобулин класса G

IgG1,2,3,4 -Субклассы 1,2,3,4 иммуноглобулинов G

IgM - Иммуноглобулин класса M

ISO Международная организация по стандартизации

MMR - вакцина против кори, эпидемического паротита и краснухи

NATA - Национальная ассоциация органов тестирования в Австралии

RAI индекс авидности

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Корь относится к высоко контагиозным (более 95%) острым вирусным заболеваниям, у значительной части заболевших характеризуется тяжелым течением. В конце XX века ежегодное число летальных исходов от кори и ее осложнений по данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) составляло около 2,5 млн. случаев [159]. В связи с большой распространенностью и социальной значимостью коревой инфекции в мире была разработана программа элиминации кори к 2010 г. Важной особенностью кори является то, что она представляет собой антропонозное заболевание. При этом специфические антитела – как постинфекционные, так и поствакцинальные, нейтрализуют все известные генотипы вирусов «дикой» кори. Эта особенность является важной предпосылкой для реализации программы элиминации кори путем формирования популяционного поствакцинального иммунитета. Согласно проведенным расчетам, для прерывания цепочек передачи инфекции необходима иммунная прослойка в 85% в возрастной группе до 4 лет, 90% - от 5 до 10 лет и 95% - от 14 лет и старше [250]. В настоящее время, согласно требованиям ВОЗ, охват прививками должен составлять не менее 95% населения.

Краснуха по характеру течения и контагиозности является менее тяжелым инфекционным вирусным заболеванием, в первую очередь она поражает восприимчивых детей. Однако краснуха чрезвычайно опасна для беременных, так как инфицирование женщины в этот период может приводить к формированию тяжелых пороков развития и даже к внутриутробной гибели плода, что получило название «синдром врожденной краснухи» (СВК) [70,170, 189]. Ежегодно в мире рождается более 100 тыс. детей с СВК, преимущественно в развивающихся странах. [153,154,155,213]. В 2004 г. ВОЗ по результатам консультаций к программе элиминации кори была добавлена также программа элиминации краснухи к 2010 г. [237, 290]. В большинстве стран вакцинация проводится комбинированной вакциной против кори и

краснухи. Кроме того, краснуха является менее контагиозным заболеванием, чем корь. Таким образом, элиминация краснухи может быть достигнута в ходе работы по элиминации кори.

Политика активной массовой вакцинации населения против кори и краснухи, проводимая под эгидой ВОЗ, дала значимые результаты. Заболеваемость корью резко снизилась, также заметно сократилась смертность от этой инфекции [274]. Задача полной элиминации кори к 2015 г. казалась близкой и реальной. Однако после первых обнадеживающих результатов из многих стран с высоким охватом вакцинацией стали поступать сообщения о вспышках кори. Это произошло после 2008 года: Австрия [210], Англия [174], Германия [152], Израиль [148], Франции [245], США [264], Россия [7,26,109]. Сроком возможной элиминации кори был назван 2020 г. На основе Стратегического плана ВОЗ по глобальной ликвидации кори и краснухи на 2011-2020 гг. (в настоящий момент продлен до 2035 г.) в России принята Программа «Элиминация кори и краснухи, достижение sporadической заболеваемости эпидемическим паротитом в Российской Федерации (2021-2025)» [47].

Заболеваемость краснухой в РФ находится на достаточно низком уровне, что позволяет расценивать ситуацию с этой инфекцией как благоприятную: в частности, за 6 месяцев 2019 г. краснухой заболело 29 человек (0,02 на 100 тыс. населения) на 7 территориях [106]. С 2017 года Россия внесена ВОЗ в список стран, элиминировавших краснуху [9].

Эпидситуация по кори несколько иная. Отмечен пик заболеваемости в 2014 г., далее был короткий благополучный период, сменившийся подъемом заболеваемости с 2017 г. в разных странах мира [180]. Более 7000 человек заболели в 2016-2017 гг. в Румынии, в основном это были маленькие дети, не привитые против кори ранее. В этой вспышке отмечен 31 летальный исход [180]. Во вспышке кори в Италии общее число заболевших составило около 4500 человек, при этом доля людей в возрасте 15-30 лет среди них доходила до 70%. Важно, что в этой когорте были как не привитые, так и получившие

вакцинацию в детстве [184]. По данным ВОЗ, число заболевших корью в мире составило 339138 человек в 2018 г. и 519490 человек – в 2019 [303]. Факты безусловно говорят о том, что достичь элиминации кори пока не удастся, несмотря на активную вакцинацию. Исключение составляет Американский регион, который верифицировал элиминацию кори в 2002г. Большое значение приобретает заболеваемость взрослых, которые были вакцинированы в детстве [243]. В ряде вспышек кори в разных странах мира значительное число заболевших составляют люди в возрастном диапазоне 18-35 лет [147, 222].

В России при изучении популяционного иммунитета против кори в различных регионах проводятся исследования уровня противокоревых IgG-антител у здорового населения. При этом выявлено повышение доли серонегативных к вирусу кори индивидуумов среди молодых здоровых людей. Согласно прививочному анамнезу, часть данной когорты обследованных не имела прививочных документов либо не прививалась, но около 50% этих людей были привиты в детстве от кори [11, 12, 55, 56].

Известен факт первичных вакцинальных неудач: от 2 до 12% привитых от кори не дают полноценного иммунного ответа на вакцинацию [235]. Кроме того, около 5% привитых быстро теряют специфические антитела, эта категория относится к вторичным вакцинальным неудачам [195]. Особую тревогу вызывает рост числа серонегативных к кори молодых взрослых. При обследовании заболевших в очагах коревой инфекции были выявлены даже дважды привитые взрослые [258, 276]. Накопленные данные, безусловно, говорят о том, что в условиях ограниченной циркуляции дикого вируса наблюдается постепенное снижение противокорьевого иммунитета в течение жизни привитых людей. Кроме установленных генетических предпосылок к невысокому и непродолжительному иммунному ответу на вирус кори, обсуждается также возможность влияния различных факторов среды обитания. Причины субоптимального иммунного ответа на вирус кори активно обсуждаются в международном научном сообществе, при этом акцент ставится на поиск предикторов слабого ответа и возможности коррекции этого

явления. [114, 195]. Однако истинная частота потери противокорьевого иммунитета у привитых, так же как и частота заболевания корью среди реально привитых, остаются до конца неясными.

На этапе реализации программы элиминации кори и краснухи, в том числе в процессе контроля состояния популяционного иммунитета, особую важность приобретают меры по повышению достоверности результатов лабораторных исследований на наличие антител к вирусу кори. Повышение точности количественного определения уровня антител необходимо для выявления неиммунной прослойки населения.. Это необходимо для оценки эффективности вакцинации, а также для прогнозирования заболеваемости.

Для исследования уровня антител повсеместно используется метод иммуноферментного анализа (ИФА), основанный на высокой избирательности и специфичности иммунологической реакции антиген-антитело. Методика является относительно простой в исполнении, однако следует учитывать, что в основе технологии иммуноферментного анализа лежат сложные физико-химические и биологические процессы, которые могут повлиять на качество полученных данных. Для полноценного осуществления контроля качества таких исследований необходимо строго выполнять требования, сформулированные в нормативных документах Минздрава России - Приказы № 45 от 07.02.2000 и № 220 от 26.05.2003 [81, 86]. Строгое выполнение требований приказов и отраслевых стандартов обязывает диагностические лаборатории при проведении каждой серии лабораторных исследований ежедневно выполнять контрольные измерения, регистрировать их результаты на контрольных картах и на основании анализа контрольных карт принимать решение о выдаче результатов каждой аналитической серии лечащим врачам.

Контроль качества лабораторных исследований очень важен с юридической точки зрения. При расследовании подозрений на врачебные ошибки достоверность лабораторных данных является одним из важных моментов, на основе которых принимается решение. Разработан ряд документов, регламентирующих порядок проведения внутрилабораторного

контроля качества (ВКК) для количественных и не количественных исследований [81, 86, 48]. Однако в этих документах отсутствуют методические подходы по оценке качества лабораторных исследований при количественном определении IgG-антител не только к вирусу кори и краснухи, но и к другим вирусам и бактериям. Поскольку в наборе для количественного определения IgG к вирусу кори имеется контрольный образец (КО) с известной концентрацией и для каждого планшета каждой аналитической серии, обязательно строится калибровочная кривая, согласно которой проводится учет результатов, казалось бы, нет необходимости в проведении контроля качества с использованием препарата для внутрилабораторного контроля (ВЛК). Однако эти критерии не контролируют стадию разведения исследуемых образцов и межсерийные различия наборов, так как калибровочные образцы и КО в наборах используются неразведенными т.е. готовыми к использованию. Наличие алгоритмов контроля качества лабораторных исследований количественного определения уровня антител важны для оценки состояния популяционного иммунитета к вирусам кори и краснухи. В связи с вышесказанным, исследования, направленные на изучение особенностей гуморального иммунитета к вирусам кори и краснухи и разработку системы контроля качества исследований соответствующих IgG-антител к вирусам кори и краснухе методом ИФА, являются весьма актуальными.

Цель работы: Изучить особенности гуморального иммунитета к антигенам вирусов кори и краснухи; разработать алгоритм проведения внутрилабораторного контроля качества при определении антител к вирусам кори и краснухи для повышения качества клинико-лабораторных исследований иммунитета к этим инфекциям.

Задачи исследования:

1. Изучить структуру коллективного иммунитета к кори и краснухе у здоровых людей разного возраста.

2. Выявить группу серонегативных к вирусу кори лиц в закрытом коллективе с последующей вакцинацией их против кори.
3. Определить состояние специфического гуморального иммунитета через 6 недель после прививки.
4. Сопоставить постинфекционный и поствакцинальный гуморальный иммунитет к вирусу кори.
5. Разработать порядок и объем процедур при использовании контрольных материалов для проведения внутрилабораторного контроля качества исследования антител к вирусам кори и краснухи методом иммуноферментного анализа.

Научная новизна

Установлено, что в возрасте 6-7 лет количество серопозитивных к вирусу краснухи достигает уровня 90% и сохраняется на этом уровне и выше вплоть до 60 лет и старше.

Обнаружено, что уровень серопозитивных к вирусу кори достигает максимума в возрастной группе 7-14 лет (81,4% от числа обследованных в этой группе). Выявлено значимое снижение уровня серопозитивных к вирусам кори в возрастной группе 18-30 лет до 57,5%.

Выявлена сильная корреляционная связь между уровнем серонегативных к вирусу кори лиц с заболеваемостью корью: любые изменения в уровне противокорьевого иммунитета в возрастных группах отражаются на заболеваемости в той же возрастной группе.

Показано, что по avidности и спектру субклассов IgG-антител, формирующихся в ответ на прививку против кори, можно объективно разделить исходно серонегативных взрослых на привитых ранее (вторичный тип иммунного ответа) и не привитых от этой инфекции (первичный тип ответа).

Доказано, что вакцинация против кори серонегативных взрослых дает высокий уровень специфических антител как у впервые вакцинированных, так

и у вакцинированных в детстве, но утративших противокоревые антитела в условиях отсутствия естественного бустирования на этапе элиминации этой инфекции.

По спектру субклассов специфических IgG-антител и их авидности впервые выявлено, что происходит увеличение количества отвечающих вторичным типом иммунного ответа как среди вакцинированных серонегативных, так и среди заболевших корью взрослых. Среди больных корью детей и подростков не было выявлено вторичного типа иммунного ответа, что свидетельствует о том, что в этой возрастной группе не было привитых.

При коревой инфекции продемонстрирован процесс переключения с раннего первичного IgG3-типа иммунного ответа (6-й день от появления сыпи) на зрелый IgG1- тип, характерный для иммунологической памяти (через 3 недели после появления высыпаний).

Показано, что использование стандартных препаратов для проведения внутрилабораторного контроля качества при проведении исследований уровня IgG-антител к вирусам кори и краснухи иммуноферментным методом позволяет избежать системных и случайных ошибок, что обеспечивает адекватный анализ результатов, полученных в разных лабораториях, на разном оборудовании и разных сериях тест-систем.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых данных, вносящих вклад в понимание процессов поддержания коллективного иммунитета к вирусам кори и краснухи в условиях спорадической заболеваемости. Показано, что на этапе элиминации кори уровень серопозитивных, достигнув пика 81,4% в возрастной группе 7-14 лет, постепенно снижается до минимума в 57,5% у лиц 18-30 лет, вероятно, из-за снижения циркуляции диких штаммов вируса и отсутствия естественного бустирования.

Прямая корреляционная зависимость между увеличенным уровнем серонегативных лиц и заболеваемостью коревой инфекцией в возрасте 18-30 лет свидетельствует о целесообразности контроля уровня антител против вируса кори среди школьников 10-11 классов для ревакцинации выявленных серонегативных.

На основании полученных в работе результатов показана целесообразность проведения исследования противокорьевого иммунитета на случайной выборке обследуемых лиц с последующим сопоставлением результатов лабораторного тестирования с данными прививочных карт.

Показано, что по спектру субклассов специфических IgG-антител и их avidности можно разделять обследуемых лиц на отвечающих первичным или вторичным типом иммунного ответа на контакт с вирусом, что позволяет сделать вывод об отсутствии или утрате гуморального иммунитета, специфичного к вирусам кори.

Впервые разработан алгоритм проведения внутрилабораторного контроля качества при выполнении лабораторных исследований по определению методом иммуноферментного анализа IgG-антител к вирусам кори и краснухи, отработаны критерии и предложен порядок проведения процедуры. Предложенный алгоритм рекомендовано использовать для отработки и проведения внутрилабораторного контроля качества при выполнении анализов указанных антител на тест-системах различных производителей.

Методология и методы исследования.

Выполнено открытое сравнительное проспективное исследование особенностей коллективного иммунитета к вирусам кори и краснухи. Получение биологического материала (кровь) произведено с учетом положений Хельсинской Декларации ВМА (2000) и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999), а также согласно с «Российскими и международными требованиями по надлежащей клинической практике» – ГОСТ Р 52379-2005, GOOD CLINICAL PRACTICE (GCP),

одобренными Российской академией медицинских наук. В соответствии с поставленной целью и для решения соответствующих задач использовались формально-логические методы для анализа научной литературы, клиничко-anamnestические, иммунологические и статистические методы исследования.

Внедрение результатов работы.

Результаты исследований и разработок Смердовой М.А. внедрены в работу Референс-лаборатории ЕРБ ВОЗ, ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора (Москва) и в работу лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора (Санкт-Петербург). По результатам исследования разработаны методические рекомендации МР 4.2.0287-22 «Организация внутреннего контроля качества в лабораториях, проводящих исследования на специфические антитела к вирусу кори методом иммуноферментного анализа», утверждены Главным государственным санитарным врачом Поповой А.Ю. 30.05.2022.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов диссертационной работы обусловлена достаточным объемом проведенных исследований с применением адекватных, современных методов, обладающих высокой чувствительностью и объективностью, выполненных с помощью современных автоматических диагностических приборов, обладающих системами автоматизированного сбора, учета и анализа данных, и использованием корректных методов статистической обработки материала.

Материалы диссертационной работы были доложены на: XI Съезде Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» (ВНПОЭМП) «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения» (Москва, 2017); Международной конференции «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных

инфекций», посвящённой 110-летию Санкт-Петербургского института имени Пастера (Санкт-Петербург, 2018); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 2019); XXV Юбилейной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Наука и практика лабораторных исследований» (Москва, 2020). Апробация диссертации состоялась на расширенном заседании секции Ученого совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора «Общая и прикладная иммунология» 12 ноября 2021 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, из них статей в журналах, входящих в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий», рекомендуемых ВАК Министерства образования и науки РФ для публикаций основных результатов диссертационных исследований – 8, в том числе статей в журналах, включенных в базу Scopus и Web of science – 4, тезисов в материалах конференций – 4.

Личный вклад автора. Автор лично осуществляла все этапы иммунологических исследований и разработки порядка и объема процедур для проведения внутрилабораторного контроля качества при исследовании антител к вирусам кори и краснухи методом иммуноферментного анализа, анализ литературы, статистическую обработку, анализ и описание полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Установлено значимое снижение уровня серопозитивных к вирусу кори среди здоровых взрослых 18-30 лет.

2. Выявлено превалирование молодых взрослых в возрасте 18-30 лет среди заболевших корью. Доказано повышение процента лиц, реагирующих на корь вторичным типом иммунного ответа.
3. Аттестованные на базе референс-лаборатории ЕРБ ВОЗ (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского) образцы «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG» пригодны для проведения внутрилабораторного контроля качества при качественном и количественном исследовании IgG-антител к антигенам вирусов кори и краснухи в сыворотках крови.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 161 странице, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, двух глав результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 21 рисунком. Список литературы содержит 305 источников, из них работ отечественных авторов – 145, зарубежных авторов – 160.

ГЛАВА 1.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современная ситуация по кори и краснухе в мире и в Российской Федерации.

1.1.1 Коревая инфекция. Ситуация по кори в мире и России.

Корь - острая высоко контагиозная, антропонозная вирусная инфекция, характеризующаяся циклическим течением, проявляющимся общей интоксикацией, макуло-папулёзной сыпью на коже, патогномоничными высыпаниями на слизистой оболочке рта, воспалением верхних дыхательных путей и конъюнктив глаз и вызывающая длительную иммуносупрессию. Корь опасна серьезными осложнениями, такими как острый энцефалит (кумулятивная частота 1:1000 больных), подострый склерозирующий панэнцефалит [229]. Осложнениями, вызванными другими инфекциями, развивающимися у 30% взрослых пациентов на фоне постинфекционной иммуносупрессии [233, 247]. Внутриутробная коревая инфекция может протекать как генерализованный системный процесс с полиорганными поражениями, выкидышами и преждевременными родами [133,134,225, 226]. В XX веке ежегодно более 20 миллионов человек заболело корью. Подавляющее большинство (более 95%) случаев смерти от кори происходит в странах с низким доходом и слабо развитой инфраструктурой.

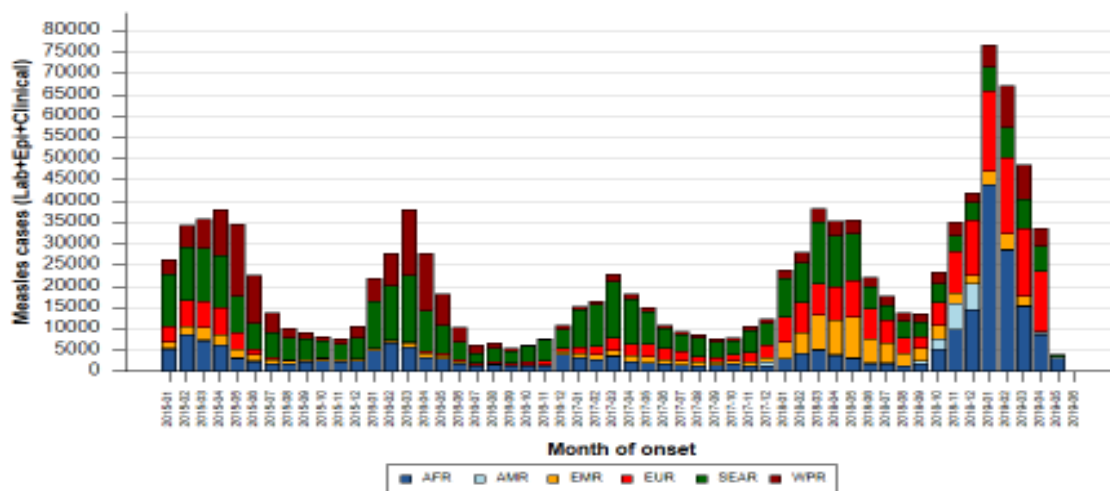
В течение длительного времени из-за высокого индекса контагиозности (90-95%) корью преимущественно болели дети. Результатом заболевания было и остается формирование стойкого пожизненного иммунитета. Реальная возможность изучения вируса и факторов противокорревого иммунитета появилась лишь в 1954 г., благодаря исследованиям Enders J.F. и Peebles T.C., [178] показавшим возможность изоляции вируса кори на клеточных культурах, накопление его в культуральной жидкости и как следствие - приготовление вакцины. Иммунопрофилактика признана во всем мире стратегической инвестицией в охрану здоровья, благополучие индивидуума,

семьи и нации с выраженным экономическим и социальным эффектом. Эффективность вакцинопрофилактики в борьбе с инфекциями доказана многолетним мировым опытом. Нет ни одной другой программы в области здравоохранения, которая дала бы столь впечатляющие результаты [62]. Однако, несмотря на наличие доступных высокоиммуногенных вакцин, корь все еще остается одной из основных причин детской смертности в развивающихся странах и периодически возникающих крупных вспышек в индустриально развитых странах.

В связи с введением иммунизации против кори заболеваемость корью в мире снизилась, но вместе с этим поменялась возрастная структура пациентов: уменьшилось число больных детей, стали регистрироваться случаи заболевания среди взрослых, подавляющее большинство которых в возрасте 18-35 лет [29,67, 203].

Особую актуальность эта проблема приобрела после принятия ВОЗ стратегического плана по борьбе с корью, целью которого было снижение смертности от кори в глобальном масштабе и элиминации инфекции в отдельных регионах мира, в том числе и Европейском, к 2010 г. [54]. Современная ситуация заболеваемости корью по 6 регионам ВОЗ (Западно-Тихоокеанский, регион Юго-Восточной Азии, в Европейский, Африканский, Восточно-Средиземноморский, Американский) в 2015-2019 г. представлена на рисунке 1.1. Из рисунка видно, что все еще сохраняется характерная для кори сезонность заболевания. В основном заболеваемость корью поддерживается за счет стран Западно-Тихоокеанского региона Юго-Восточной Азии и Африканского региона. Причиной заболеваемости корью в Африканском регионе является низкий процент охвата детей одной дозой коревой вакцины, который колебался в эти годы от 50 до 79%.

Measles case distribution by month and WHO Region (2015-2019)



Notes: Based on data received 2019-06 - Data Source: IVD Database - This is surveillance data, hence for the last month(s), the data may be incomplete.

2019-06-12

Рисунок 1.1- Заболеваемость корью в мире по данным ВОЗ.

По статистике ВОЗ, в 2017 г. самый высокий уровень заболеваемости корью в Европейском регионе был зарегистрирован в Румынии, Италии, Украине, Греции, Германии, Бельгии, Франции, Польше, Сербии, Таджикистане [305]. В 2018-2019 гг. процесс повышения заболеваемости корью продолжился, вовлекая в эпидемический процесс все большее число стран (Сербия, Румыния, Россия, Италия, Германия, Франция) [303].

После 10-летнего эпидемического благополучия появились вспышки кори и в Американском регионе: одиннадцать вспышек кори, были зарегистрированы по состоянию на октябрь 2018 г. [168]. Заболеваемость корью в США продолжилась и в 2019 г.: в 30 штатах было зарегистрировано более 1000 подтвержденных случаев кори; подавляющее большинство не были привиты против кори или имели неизвестный прививочный анамнез.

Эпидемическую ситуацию по кори в России существенно изменило введение обязательной вакцинации населения живой высокоэффективной отечественной вакциной, полученной на основе штамма Ленинград-16 (Л-16), комбинированной вакциной корь-паротит, разработанной Московским

предприятием бактериальных препаратов (МПБП) ФГУ «НПО «Микроген» МЗиСР РФ. В настоящее время вводится в календарь прививок тривалентная вакцина (корь-паротит-краснуха). Плановое повсеместное проведение вакцинопрофилактики кори в России начато в 1967 г., а с 1986 г. введено двукратное введение вакцины - в возрасте 12 месяцев и 6 лет. С 2008 года в календарь введена прививка взрослым в возрасте до 35 лет, [73, 74, 79, 83, 94, 124, 129, 142, 143] не болевшим, не привитым, привитым однократно, не имеющим сведений о прививках против кори [88]. С помощью специфической профилактики значительно снизился уровень заболеваемости: среднемноголетний показатель 0,69 на 100 тыс. населения, что в 27 раз ниже по сравнению с периодом ревакцинации и в 1363,8 раза ниже по сравнению с довакцинальным периодом [112]. Однако ситуация по кори в России в последние 4 года также, как и в большинстве других стран, осложнилась. Если в 2016 г. было зарегистрировано 178 случаев (0,12 на 100 тыс. населения), то в 2017 г. - 721 (0,41 на 100 тыс. населения), в 2018 г. - 2539 (1,73 на 100 тыс. населения), в 2019 г. - 4491 (3,06 на 100 тыс. населения). Большинство случаев заболевания в 2018 г. связано с завозными случаями [59, 65, 106, 130, 143].

Таким образом, анализ заболеваемости корью в мире показал, что за 2 года (2018-2019 гг.) во всем мире заболеваемость увеличилась почти на 300%. В Африканском регионе прирост составил 700%, в регионе стран Америки - 60%, в Европейском регионе - 300%, в регионе Восточного Средиземноморья - 100%, а в регионах Юго-Восточной Азии и Западной части Тихого океана - 40% [301].

1.1.2 Краснушная инфекция. Ситуация по краснухе в мире и России.

Краснуха - повсеместно распространенное вирусное инфекционное заболевание, передающееся воздушно-капельным путем, протекающее, как правило, в легкой, иногда бессимптомной форме. Медицинская и социальная значимость краснухи обусловлена, прежде всего, тератогенным действием вируса краснухи. Благодаря небольшим размерам вирус способен проникать

через плаценту, что приводит к инфицированию плода и, в зависимости от срока беременности, может привести к прерыванию беременности, смерти плода, рождению детей с СВК, включающем слепоту, глухоту, врожденные пороки сердца, умственную отсталость и неврологические осложнения [53, 70, 170, 185, 189, 219, 220, 248, 271]. Краснуха была впервые описана двумя немецкими врачами в середине XVIII века [185]. В 1941 г. австралийский офтальмолог Норман Макалистер Грегг заметил, что у младенцев, рожденных от матерей перенесших краснуху в течение первого триместра беременности, были катаракта и пороки сердца 1941 [192]. Позднее аналогичные наблюдения были сделаны и другими авторами [165, 191, 223]

Единственным научно обоснованным методом профилактики СВК является вакцинация. Первая вакцина против краснухи стала доступна в 1969 году [220, 286]. Опыт массовой вакцинации детей в возрасте от 1 - 2 лет, проведенный в США в 1969 г., показал снижение заболеваемости краснухой, однако случаи СВК продолжали регистрироваться [158, 232].

В Англии была проведена селективная вакцинация девочек-подростков и неиммунных женщин, что привело к значительному снижению заболеваемости краснухой беременных женщин и выявлению случаев СВК, но показатели коллективного иммунитета остались на низком уровне [154]. Австралия была одной из первых стран, в которой в 1971 г. была реализована государственная программа иммунизации против краснухи, а в 1989-1992 г. была введена вакцинация против кори, эпидемического паротита и краснухи (MMR) для детей в возрасте 12 месяцев и вторая доза для мужчин и женщин, причем мальчиков в возрасте 10–14 лет прививали в рамках школьных программ в 1993 и 1994 г. [175].

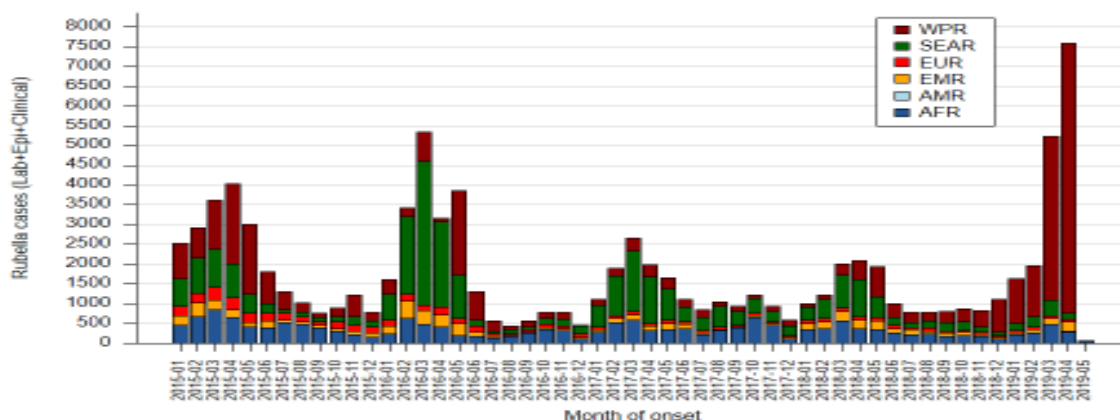
Наиболее эффективной является стратегия, которая направлена на полную элиминацию вируса краснухи из человеческой популяции. Для достижения этой цели необходимо использовать плановую вакцинацию детей

12 месячного и школьного возраста. При этом охват прививками должен составлять не менее 95 %.

Каждая страна самостоятельно, с учетом своих материально-технических ресурсов определяет необходимость введения программы вакцинопрофилактики. Так, в Эфиопии, даже, несмотря на увеличение числа случаев краснухи (127 вспышек в 2009–2015 гг.), национальная вакцинация против краснухи еще не введена. Расширенную программу иммунизации детей в возрасте до 1 года против кори и краснухи страна планирует ввести в 2019 г. [146]. Несмотря на высокую распространенность СВК в Африканском регионе, [230, 234], лишь немногие страны ввели вакцинацию против краснухи в свои национальные программы иммунизации. В отсутствие таких программ, единственным надежным методом профилактики СВК является вакцинация женщин не менее чем за 3 месяца до планирования беременности [31, 44, 53, 98, 104, 125, 231]. ВОЗ рекомендует странам, не имеющим национальных программ вакцинации против краснухи, оценить риски заболевания краснухой и СВК с помощью серо-эпидемиологических исследований, которые могут проводиться параллельно с эпиднадзором за корью [285]. По оценкам ВОЗ, в 2010 г. в мире родилось более 100 000 детей с СВК [154, 155, 213]

Данные эпидемического процесса, представленные на рисунке 1.2 показали, что краснушная инфекция распределена по регионам ВОЗ неравномерно [277]. Заболеваемость краснухой на всем протяжении анализируемого периода (2015-2019 гг.) поддерживалась странами Западно-Тихоокеанского региона, региона Юго-Восточной Азии и в странах Африканского региона. По данным ВОЗ с мая 2018 г. по апрель 2019 г. в странах Европейского и Американского регионов из 4516 и 29074 подозрительных случаев краснуха была подтверждена в 3 - 4% соответственно [302].

Rubella Case Distribution by Month and WHO Region (2015-2019)



Notes: Based on data received 2019-06 - Data Source: IVD Database - This is surveillance data, hence for the last months, the data may be incomplete.

2019-06-12

Рисунок 1.2 - Заболеваемость краснухой в мире по данным ВОЗ

Эпидемическую ситуацию в России в отношении заболеваемости краснухой существенно изменило введение обязательной вакцинации населения. В России вакцинация против краснухи была включена в календарь прививок только в 1997 г. [79]. Из-за отсутствия отечественной вакцины, РФ одна из немногих европейских стран, которая стала проводить полномасштабную вакцинацию против краснухи относительно недавно с 2001 г. [79].

В 2002 году в новый календарь вакцинопрофилактики была включена вакцинация против краснухи девочек в возрасте 11-13 лет [33, 34, 35, 54, 88]. В последние годы (2016-2019) ситуация по краснухе складывается благополучно. В 2015 г. страна впервые достигла целевого показателя элиминации инфекции – менее 0,1 на 100 тыс. населения, который задокументирован и в последующие годы: 2016 г.- 0,03; в 2017 г. и 2018 годах зарегистрировано по 5 человек с показателями заболеваемости 0,004 на 100 тыс. населения [105]. В 2018 г. комиссией по верификации элиминации ВОЗ признана элиминация краснухи на территории России.

1.1.3 Стратегический план Всемирной Организации здравоохранения по элиминации кори и краснухи к 2020 г.

Концепция элиминации кори была рассмотрена Международной целевой группой по искоренению заболеваний, а также независимой группой экспертов в 1996 г., в результате чего была подтверждена возможность элиминации кори и краснухи, основанием которой являются: наличие единственного хозяина (человека), типичной клинической картины, стойкого иммунитета после перенесенного заболевания, единого антигенного варианта вируса, отсутствие носительства вируса у человека. Было установлено, что искоренение кори и краснухи одновременно к 2020 г. является наиболее эффективным с точки зрения финансовых затрат [221, 266,290, 298]. Для работы по надзору за отдельными инфекциями, в том числе корью и краснухой (натуральная оспа, полиомиелит, корь, краснуха и др.) в мире ВОЗ сформированы 6 регионов: Африканский, Американский, Восточно-Средиземноморский, Европейский, Западно-Тихоокеанский, регион Юго-Восточной Азии и создана диагностическая лабораторная сеть по всему миру, состоящая в настоящее время из 704 лабораторий. Создание высокопрофессиональных диагностических лабораторий, выполняющих серологические, вирусологические и молекулярно-генетические исследования, с высокими показателями качества исследований, действующих по единому стандартному протоколу, обеспечивает своевременное получение полных и достоверных лабораторных данных, позволяющих оценивать эпидемическую ситуацию в мире [126,137, 138, 139, 140, 143, 161, 163, 232,237, 252, 253, 254, 257, 297, 296]

По оценкам ВОЗ к 2010 году смертность от кори в мире снизилась на 74%: с 535 300 летальных случаев до 139 300 в 2010 г., чему способствовало введение в глобальном масштабе моновалентной вакцины против кори MCV1 в 2008 г. В период с 2010 по 2015 г. число стран с охватом MCV1 $\geq 90\%$ выросло с 84 (44%) до 119 (61%). К 2015 г. в 160 (82%) из 194 государств-членов была предложена вторая доза, вводимая через организованные службы

иммунизации (MCV2), по сравнению с 97 (50%) в 2000 году [160, 162, 190, 302]. Вместе с тем на ряде территорий региона Юго-Восточной Азии (Индия) и Африканском регионе смертность снизилась лишь на 36-47%. Глобальный план действий в отношении элиминации кори и краснухи был пересмотрен, и выполнение его было перенесено на 2015 г. Предполагалось, что провозглашенная ВОЗ цель ликвидации кори/краснухи в XXI веке к 2015 г. будет достигнута [272]. Однако уже с 2008 г. во многих странах, даже с высоким охватом прививками, таких как Великобритания, Германия, Франция, Австрия, США, Россия, стали регистрироваться вспышки кори [113, 131, 132, 264] в связи с чем были пересмотрены и конкретизированы стратегические планы, выполнение которых намечено на 2020 г. [292, 295].

Европейский план действий по вакцинации на 2015-2020 гг. (EVAP) предусматривает стратегию достижения высокого уровня иммунизации населения (свыше 95% населения) с использованием двух доз вакцины, что обеспечит защиту популяции, включая младенцев, не вакцинированных по возрасту и тех, кто не может быть иммунизирован по медицинским показаниям. ВОЗ рекомендует вакцинацию против кори всем восприимчивым детям и взрослым, у которых нет противопоказаний. Введение детям 2-х доз вакцины от кори, как отдельно, так и в сочетаниях корь-краснуха, корь-эпидемический паротит-краснуха или корь-эпидемический паротит-краснуха-ветряная оспа является стандартом для всех национальных программ иммунизации [181].

Данные по охвату вакцинацией против кори служат показателем качества программ иммунизации, в то время как заболевание корью «выделяет» конкретные географические районы и группы населения, в которых требуется укрепление служб по вакцинопрофилактике [134, 182, 278, 284, 303]. Число погибших в 2019 г. составило 142 300 человек, из них большинство - дети в возрасте до пяти лет, которые не были привиты [188, 246, 301]. Одной из причин, по которой дети до пяти лет не были привиты, это отказ родителей от вакцинации детей против кори вакциной MMR, которая по их мнению могла

быть причиной аутизма [156, 172, 199, 206, 211, 212, 214, 240, 241, 249, 255, 256, 260, 265]. Однако опасения развития аутизма после прививки MMR были развенчаны датскими исследователями [202]. Религиозные убеждения, недоверие к системе здравоохранения и страха по поводу реакций на вакцины в виде риска возникновения синдрома внезапной детской смерти и дефицита внимания / гиперактивности увеличивают число больных корью [151, 176, 224]. По данным European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), основной причиной эпидемии является резкое уменьшение количества привитых детей, подростков и молодых взрослых, результаты обследования которых показали, что 80% лиц этих возрастных групп, заразившихся корью в 2017 г., не были вакцинированы [180].

Программа ликвидации местных случаев кори на территории РФ к 2010 году была утверждена в 2002 г. приказом министерства здравоохранения РФ № 270 в соответствии с резолюцией ВОЗ о ликвидации кори в Европейском регионе [141]. Национальный план мероприятий по элиминации кори в РФ первоначально был рассчитан на 3 этапа: 2002–2004 гг., 2005–2007 гг., 2008–2010 гг. [1, 2, 59, 107]. Первые два этапа Программы (2002-2004 гг. и 2005-2007 гг.) были направлены на создание условий, предупреждающих распространение инфекции в случае ее возникновения. Цель третьего этапа – подтверждение статуса территорий, свободных от местных случаев кори [110]. Однако уже с 2011 г., так же как и в других европейских странах, в России стали регистрироваться вспышки кори (показателем заболеваемости 2,4 на 100 тыс. населения), которые продолжились до 2016 г., когда показатель заболеваемости составил 0,12 на 100 тыс. населения. Дальнейшие мероприятия по элиминации кори и краснухи проводились согласно Программе «Профилактика кори и краснухи в период верификации их элиминации в РФ (2016–2020 гг.)» целью которых является достижение заболеваемости корью на уровне единичных случаев на территории Российской Федерации [14, 28, 30, 136]. На основе Стратегического плана ВОЗ по глобальной ликвидации кори и краснухи на 2021-2025 гг. в России принята

программа «Элиминация кори и краснухи, достижение спорадической заболеваемости эпидемическим паротитом в Российской Федерации (2021-2025).

1.2. Вирусы кори и краснухи. Маркеры коревой и краснушной инфекций.

1.2.1. Серологические маркеры коревой и краснушной инфекций.

Методы определения.

Вирус кори - это оболочечный вирус с негативным одноцепочечным РНК-геномом, относится к роду *Morbillivirus* семейства *Paramyxoviridae* [263], который содержит шесть генов, кодирующих шесть структурных белков (N, P, M, F, H и L) и два неструктурных белка (С и V) [193, 194, 263]. Хотя вирус кори считается монотипичным вирусом, генетические и антигенные вариации были обнаружены в вирусах дикого типа [253]. Согласно стандартизированной номенклатуре ВОЗ с использованием нуклеотидных последовательностей переменных генов N и H, вирус кори дикого типа делятся на 24 генотипа. Высоко варибельная 450-НТ последовательность, кодирующая C-концевую часть белка N (область N-450), используется для дифференцировки обнаруженного вируса кори в эпиднадзоре за коревой инфекцией [291, 293]. Морфология вируса типична для парамиксовирусов. Диаметр вириона 150—250 нм. Вирион имеет округлую форму, снаружи покрыт липопротеиновым суперкапсидом. Изнутри к суперкапсиду прилегает слой матричного белка. Основные белки: нуклеокапсидный протеин NP, матричный белок M, а также поверхностные гликозилированные белки липопротеиновой оболочки — гемагглютинин H и белок слияния F. В отличие от других парамиксовирусов, у вируса кори отсутствует нейраминидаза [273].

Вирус краснухи – одноцепочечный РНК-вирус, принадлежащий к *Togaviridae* [275]. В настоящее время вирус краснухи является единственным известным оболочечным вирусом, имеющим спиральную структуру на своей поверхности. Вирионы имеют диаметр частиц в диапазоне от 60 до 80 нм. Вирус краснухи кодирует два неструктурных (p150 и p90) и

три основных структурных белка: капсидный белок С (≈ 31 кДа), гликопротеины Е1 (58 кДа) и Е2 (42–47 кДа). Неструктурные белки необходимы для репликации и транскрипции вируса. Капсидный белок С окружает нить РНК и участвует в образовании нуклеокапсида, оболочка которого состоит из фосфолипидов и холестерина мембраны клетки хозяина со встроенными вирусными гликопротеинами Е1 и Е2. Белки Е1 и Е2 образуют шипы на поверхности вирионов и отвечают за связывание с рецепторами клеток хозяина и слияние мембран во время проникновения вируса в клетку. Гликопротеин Е1 вызывает рецепторопосредованный эндоцитоз и является иммунодоминантным антигеном. Гликопротеин Е2 образует связи между рядами гликопротеинов Е1. Капсидный белок С в дополнение к его структурной роли в образовании нуклеокапсида модулирует репликацию вирусной РНК, сбор вириона и оказывает антиапоптотический эффект, изменяя физиологию митохондрий. Индукция апоптоза, по-видимому, является основным механизмом, посредством которого создается цитопатический эффект. Вирус краснухи серологически монотипичен, однако показал достаточно генетическую изменчивость и включает 13 распознанных генотипов (1А, 1В, 1С, 1D, 1Е, 1F, 1G, 1H, 1I, 1J, 2А, 2В, 2С) [43, 135, 157, 186, 228, 294].

Открытия, показавшие возможность размножения вирусов кори/краснухи в культуре клеток позволили не только создать специфические вакцины, но и определили интенсивное развитие исследований, направленных на изучение биохимических, биологических свойств вирусов, разработку методов выявления антигенов и определение антител.

Известно, что IgM-антитела к вирусу краснухи и кори появляются в крови обследуемых пациентов на 3-4 сутки после появления сыпи и сохраняются в течение 1-3 месяцев. IgG-антитела появляются вскоре после IgM и сохраняются на всю жизнь. В редких случаях, через 15-20 лет после перенесенной краснухи или кори, специфические IgG-антитела перестают определяться. Адекватным сроком сбора образца сыворотки для выявления

IgM, к вирусам кори/краснухи с помощью ИФА, при котором вероятность положительного результата теста составляет 90-100%, является срок с 4 по 28 день с момента появления сыпи [42, 58, 103, 300].

По способности выявления возбудителей коревой/краснушной инфекций методы лабораторной диагностики могут быть разделены на две группы: прямые, позволяющие выявлять в биологических жидкостях или тканях человека вирус кори/краснухи или антигены и непрямые, способные регистрировать специфический иммунный ответ у пациента как при заболевании, так и при вакцинации.

В настоящее время с развитием методов иммунохимии и молекулярной биологии выявление вируса и его антигенов в клинических образцах от больного может быть осуществлено радио - и энзиматическими методами; обнаружением вирусной рибонуклеиновой кислоты (РНК) методом молекулярной гибридизации, использованием амплификации гена и с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР позволяет выявлять специфические антигены при содержании в обследуемых материалах инфекционного вируса не менее 1,0-2,5lg (LD⁵⁰) [5, 6, 7, 57, 157, 177, 207, 208].

Однако в клинико-эпидемиологической практике для лабораторной диагностики кори/краснухи используются в основном серологические (непрямые) методы по определению специфических антител, так как они более доступны и не ограничены периодом вирусемии. Для выявления специфических антител используются следующие серологические методы: реакция нейтрализации, реакция связывания комплемента, реакция торможения гемагглютинации, реакция пассивной гемагглютинации, реакция агглютинации латекса, реакция радиального гемолиза, иммунодиффузия, радиоиммунный анализ, иммуноферментный метод (ИФА). Несмотря на широкий спектр методов диагностики кори/краснухи, основным в рутинной работе является ИФА, который отвечает всем требованиям, улавливает весь спектр антител к различным антиген значимым белкам вируса, обладает высокой специфичностью, дает возможность получать объективные данные,

что позволяет использовать его для проведения широкомасштабных серологических исследований. Для выявления антител IgM и IgG классов имеются различные по модификации (формату) коммерческие тест-системы (тесты) с разной чувствительностью и специфичностью, которые используются для решения задач эпидемиологического надзора в рамках программы элиминации кори и краснухи [40, 93, 149, 238, 259, 262, 283].

В России зарегистрированы следующие производители тест-систем АО «Вектор-Бест», ЗАО «Эколаб», ООО «НПО «Диагностические системы» и "Euroimmun" (Германия), которые предлагают наборы для определения антител класса IgM и IgG, а так же для выявления низкоавидных IgG-антител (индекса Авидности) для вирусов кори и краснухи. Анализ на низкоавидные антитела как правило, появляющиеся в начальной стадии инфекции, используется для дополнительного анализа, если определение антител класса IgM дало неоднозначный результат. Тест-системы для определения антител к вирусу кори и краснухи имеют одинаковый принцип анализа. В качестве антигена для кори используют антиген на основе вирусного лизата или высокоочищенный рекомбинантный нуклеопротеин вируса, экспрессированный в клетках эукариот или рекомбинатные антигены вируса. Для краснухи в качестве антигена используются натуральные высокоочищенные антигены вируса (штамм HPV-77), полученного в культуре клеток Vero. Тест-системы выпускаются в двух форматах. Это тесты «indirect»-формата, то есть непрямой метод ИФА, в качестве сорбента на поверхности лунок полистиролового планшета используется антиген. При наличии в исследуемом образце IgM или IgG-антител к вирусу кори или краснухи они связываются с антигенами возбудителя, сорбированными в лунках планшета. Образовавшийся комплекс связывается с конъюгатом (антитела к иммуноглобулинам человека, меченные пероксидазой). Наличие комплекса антиген/антитело выявляется в ферментативной реакции пероксидазы с перекисью водорода в присутствии тетраметилбензидина (ТМБ). И тесты «capture»-формата, которые, как правило используются только

для определения IgM. В качестве сорбента используется моноклональные антитела анти-IgM человека. В реакции с сыворотками крови, все IgM антитела связываются с анти-IgM человека и на второй стадии при добавлении конъюгата - антигенов к вирусам кори или краснухи, меченных пероксидазой, связывается с ними. Наличие комплекса антиген/антитело выявляется затем по цветной реакции с субстратом пероксидазы тетраметилбензидином (ТМБ).

Наборы для определения иммуноглобулинов М как для кори, так и для краснухи являются качественными, то есть определяется наличие или отсутствие антител. А вот с помощью наборов для определения иммуноглобулинов G как для кори, так и для краснухи можно определить количественное содержание антител в МЕ/мл.

Принцип действия тест-систем на авидность основан на том, что иммуноглобулины класса G к вирусу кори или краснухи связываются с антигенами вируса краснухи или кори, сорбированными на поверхности лунок полистеролового планшета. Под действием диссоциирующего раствора комплексы антигены вируса – низкоавидные IgG диссоциируют, степень диссоциации зависит от авидности IgG к вирусу. Недиссоциированные комплексы связываются с конъюгатом - антителами против IgG человека, меченными пероксидазой хрена. Далее, после добавления индикаторного раствора (хромоген – ТМБ) в результате ферментативной реакции реакционная смесь в лунках планшета окрашивается пропорционально концентрации антител класса G к вирусу. Интенсивность окрашивания регистрируется с помощью спектрофотометра. [42, 58, 99, 100, 101, 102, 103]

Диагностическая значимость маркеров инфекции и корректная интерпретация результатов лабораторных исследований в значительной степени зависят от типа антигена и сроков сбора исследуемого образца.

Все вышеперечисленные производители рекомендуют использовать тест-системы на IgM-антитела для ранней диагностики первичной краснухи или кори, а так же для диагностики бессимптомно текущей реинфекции. Назначение тест-систем для количественного определения IgG-антител, не

зависимо от используемого антигена, - это диагностика заболевания, а также для оценки напряженности иммунной защиты. Результаты анализа выражаются в стандартизованных международных единицах, что позволяет достоверно определять содержание антител без дополнительной процедуры титрования исследуемых сывороток. Это экономит реагенты, время, снижает риск ошибок.

1.2.2. Популяционный иммунитет. Успехи и проблемы.

Формирование и поддержание специфического иммунитета является сложным процессом, обеспечивающим защиту от инфекции и факт обнаружения антител является лишь маркером, который свидетельствует о встрече организма с диким или вакцинным вирусом [166, 300]. В тоже время, следует отметить, что важным компонентом эпиднадзора является оценка популяционного иммунитета, в том числе с помощью серологических методов [24, 209]. Каждая страна самостоятельно определяет необходимость проведения серологических исследований по выявлению «пробелов» в иммунитете больших популяций. По заключению Европейского центра профилактики и контроля заболеваний (ECDC) страны, проводящие регулярные кампании для достижения высокого иммунитета населения, должны рассматривать вопрос о прекращении кампаний только тогда, когда более 90-95% охвата вакцинацией будет достигнуто на национальном уровне [299].

Проведенные исследования по определению антител класса IgGк вирусу краснухи среди женщин (2010-2012 гг.) Западно-Тихоокеанского региона (Китай, Вьетнам) показали, что более 40% женщин детородного возраста восприимчивы к краснухе. Во Вьетнаме 2000 женщин в 2011 г. перенесли краснушную инфекцию во время беременности и около 100 детей родились с СВК [150, 236, 270, 304, 215, 183]. Группой авторов был сделан систематический обзор результатов определения серологических маркеров к вирусу краснухи беременных женщин и детей за период 2002-2014 гг. на

территории Африканского региона: в популяции специфические антитела к вирусу краснухи были выявлены в 52,9 - 97,9 %, подобный показатель обнаружения антител среди беременных женщин колебался от 2,1% до 47,1%. Было установлено, что концентрация антител снижалась быстрее после одной, чем после 2-кратного введения вакцины [261].

Сравнительные исследования популяционного иммунитета в странах Европейского, Африканского региона, а также региона Юго-Восточной Азии показали, что серопозитивность к вирусу краснухи была высокой – в Европе (95-98%), в Африке и в Азии эти показатели составили 53% и 43% соответственно, что обусловлено разным охватом вакцинацией против краснушной инфекции [149].

Ряд исследований, проведенных в различных провинциях Ирана (Восточно-Средиземноморский регион), где проводится профилактика и контроль кори и краснухи [289], показали, что уровень иммунитета против краснухи у женщин репродуктивного возраста (15-45 лет) составляет 69,9-97% [179]. При этом, даже, несмотря на высокий иммунитет к вирусу краснухи среди беременных иранских женщин, рекомендуется скрининг на антитела к вирусу краснухи для всех женщин детородного возраста [149].

В России в рамках решения задач программы «Элиминация кори и краснухи, достижение спорадической заболеваемости эпидемическим паротитом в Российской Федерации (2021-2025)» проводятся серо-эпидемиологические мероприятия по определению противокоревоего иммунитета у привитых коревыми вакцинами [68,71]. Популяционный иммунитет 92-95% считается необходимым для прерывания передачи кори [242]. В работе Цвиркун О.В. с соавторами показана возможность использования математического моделирования процесса элиминации кори в России. Были сопоставлены экспериментальные данные математической модели с фактическими данными и доказана возможность использования методов математического моделирования для элиминации кори в стране [128, 129]. Несколькими группами исследователей при определении уровня

противокоревых IgG в разных регионах РФ показано, что часть (40 - 80%) молодых здоровых серонегативных взрослых, согласно прививочным документам, была привита в детстве от кори, другая часть обследованных либо не была привита, либо не имела прививочных документов [10,11,12, 55,56].

Как показывает практика, определение коревых антител G класса с помощью ИФА, выявило не только существенное снижение показателей специфического иммунитета у привитых с годами, но и несоответствие показателей заболеваемости корью с результатами определения иммунитета у привитых коревыми вакцинами, особенно на территориях с низкой заболеваемостью или ее отсутствием [59, 295, 300]. Это может быть связано с отсутствием бустер эффекта, вызываемого диким вирусом, и с использованием тест-систем, способность выявления антител которых зависит от их аналитических характеристик [24, 166, 167, 187, 197, 198].

Другим, не менее важным вопросом, является интерпретация результатов ИФА. Особую актуальность эта проблема имеет при необходимости проведения ревакцинирующих прививок, так как при низкой чувствительности наборов существует опасность вакцинации лиц, в сыворотках которых содержатся противокоревые антитела, то есть происходит сильная недооценка положительных результатов [166, 187, 198, 205, 269, 251]. Ситуация, при которой исследователи получают разные по значимости данные, требует проведения стандартизации полученных результатов, составной частью которой является оценка качества результатов, получаемых при использовании различных тест-систем. Подобная процедура крайне необходима для достижения сопоставимости данных популяционного иммунитета не только к вирусам кори и краснухи, но и другим инфекциям, не только между лабораториями, но и между странами. Так, с целью улучшения серологического надзора за различными инфекциями, предотвращаемыми вакцинацией, Европейской лабораторной сетью проведена стандартизация результатов выявления антител к вирусу кори, полученных лабораториями 22

стран. Большинство лабораторий (15/22), в которых использовались разные тест системы, было получено высокое общее совпадение (>95%) [173, 268, 274]. Были предприняты попытки исследований по переоценке уровня антител, указывающих на сопоставимость значений отсекающей зоны (отрицательной–положительной) [38]. Однако на этапе элиминации кори и краснухи необходимо использовать методы контроля качества исследований, которые обеспечат получение достоверных результатов предусмотренных в приказах РФ и рекомендациях ВОЗ [81, 86, 300].

1.3 Контроль качества результатов лабораторных исследований.

1.3.1. Нормативная база контроля качества результатов лабораторных исследований в мире и в РФ.

Управление контролем качества (КК) развивалось в течение последних 80 лет на основе работ основоположников системы качества. К ним можно отнести Ф.Тейлора, Г.Форда, В.Шухарта, Э.Деминга, Дж.Джурана, К.Исикаву, А.Фейгенбаума, Г.Тагути, Ф.Кросби, Д.Харрингтона [23]. Система управления качеством применима к медицинским лабораториям в той же степени, что и к производству и промышленности. Лабораторное обеспечение КК исследований это общая программа, которая охватывает сбор образцов, процессы испытаний, а также точную интерпретацию результатов и своевременную отчетность. Лаборатория является сложной системой и для достижения качества все звенья системы должны работать правильно. Подходы к внедрению КК могут различаться в зависимости от местных обстоятельств.

В настоящее время имеется несколько международных организаций, которые занимаются вопросами КК лабораторных исследований. Крупнейшей из них является Международная организация по стандартизации (ISO), которая является разработчиком международных стандартов для клинических лабораторий и лабораторий общественного здравоохранения. ISO представляет собой сеть институтов стандартизации из 157 стран,

центральный секретариат которой в Женеве (Швейцария) [204]. Это неправительственная организация, которая является посредником между государственным и частным сектором. Многие лаборатории мира прошли аккредитацию по стандарту [16] ГОСТ Р ИСО 15189-2015. Стандарт ISO может быть использован сетевыми лабораториями при разработке своих систем управления качеством и оценке собственной компетентности. Преимущество документов ISO состоит в том, что они указывают на то, что должно быть достигнуто (разработка КК для проверки предполагаемого качества результатов), не ограничиваясь текущей практикой [108, 279, 281, 282].

Второй организацией, регламентирующей КК, является ВОЗ [300], которая разрабатывает стандарты для диагностических лабораторий по конкретным заболеваниям (полиомиелит, корь, краснуха и др.). Лаборатория, претендующая на то, чтобы стать частью сети по элиминации той или иной инфекции, должна быть аккредитована ВОЗ. ВОЗ обозначила семь критериев, к числу которых, среди прочих, относится и использование внутрилабораторного контроля качества исследований.

Есть еще несколько организаций, которые занимаются разработкой стандартов:

1. Институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI)-это некоммерческая организация мирового уровня, которая способствует разработке и использованию стандартов и рекомендаций, принятых на основе добровольного консенсуса в организациях охраны здоровья.

2. Европейский комитет по стандартизации (ЕКС) был основан в 1961 национальными органами стандартизации Европейского экономического сообщества и ассоциированных стран. Основными принципами деятельности комитета являются открытость и прозрачность, консенсус и интеграция.

В некоторых странах установлен национальный процесс сертификации медицинских лабораторий для регулирования поправок к клиническим лабораторным усовершенствованиям (CLIA) и Агентство пищевых продуктов

и лекарств (FDA) в США [280]. Национальная ассоциация органов тестирования (NATA) в Австралии выполняет функции по КК медицинских исследований. В странах Европы соответствие качества медицинских изделий, установленным требованиям Директивы Европейского союза отмечается нанесением на товарную продукцию CE-марки [27].

В России при оказании медицинских услуг населению клинико-диагностическими лабораториями (КДЛ) используются диагностические наборы реагентов, разрешенные к применению приказами РФ [79, 82]. В течение длительного периода времени функции государственного КК изделий медицинского назначения для *in vitro* диагностики выполняли различные экспертные лаборатории под общим руководством Комитета медицинских иммунобиологических препаратов при ФГУН «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» [80]. С утверждением административных регламентов текущий КК медицинских изделий был передан Росздравнадзору. Следует однако, отметить, что порядок практического проведения такого контроля и перечень учреждений, ответственных за его реализацию, до настоящего времени окончательно не определен [69, 72, 87].

Шагом к систематическому использованию внешней оценки качества (ВОК) для совершенствования клинических лабораторных исследований стал приказ [75], которым предусматривалось создание региональных систем ВОК, были утверждены методические указания по осуществлению межлабораторного КК лабораторных исследований, определена программа межлабораторного контроля, приведена таблица допустимых аналитических показателей контрольных образцов. На Всесоюзный центр профилактической медицины было возложено осуществление межлабораторного КК биохимических анализов, производство контрольных материалов и их аттестация, проведение межлабораторного контроля в КДЛ. Всесоюзному научно-методическому центру и Контрольному центру по клинической лабораторной диагностике МЗ СССР было поручено обеспечить научно-методическое руководство межлабораторного КК. Создание

общенациональной системы ВОК лабораторных исследований было продолжено в новых условиях приказами, в которых был описан методический подход проведения контроля качества, назначены ответственные [60, 76, 77, 78]. Одним из важных указаний в этих документах была задача обеспечения сопоставимости результатов, получаемых в разных лабораториях при участии в Федеральной системе внешней оценки качества (ФСВОК) всех КДЛ [17]. Разработка нормативной базы проведения этапов КК продолжается. Так, в ГБУЗ г. Москвы «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы» в повседневную работу биохимического отделения бюро был внедрен внутрилабораторный контроль качества, что позволило им значительно сэкономить бюджетные средства, затрачиваемые на регулярное приобретение дорогостоящих реактивов [4, 81, 123, 220].

В настоящее время, благодаря профессору Ф. В. Меньшикову, мы имеем целую серию национальных стандартов КК для лабораторных исследований [16].

1.3.2 Внешняя оценка качества и внутрилабораторный контроль качества исследований.

Ни один аналитический метод не дает абсолютно точных результатов. Именно в силу наличия случайных и систематических ошибок при всех лабораторных исследованиях необходимо обязательное проведение процедур **КК**, одним из составных частей которого является **ВОК**, целью которой является межлабораторное сравнение полученных данных. Однако полученные результаты характеризуются разбросами полученных показателей, погрешностями при воспроизведении измерений. Возможные отклонения оцениваются с помощью другой составляющей КК - **внутрилабораторным контролем качества**. ВКК является оперативной формой контроля, по результатам которого аналитические данные могут быть отбракованы до принятия клинического решения, тогда как ВОК – это

ретроспективная оценка качества. Таким образом, ВОК и ВКК дополняют, но не заменяют друг друга. Огромным прорывом в этом направлении стала разработка правил Вестгарда в 1981 г. [280]. Этот подход прост, нагляден и не требует вычислений при интерпретации результатов конкретного измерения. Процедуры как ВОК, так и ВКК могут и должны проводиться как для количественных, так и для качественных методов исследования, что позволяет обнаружить случаи неисправности оборудования, реагентов и ошибки персонала [217].

В РФ начиная с 2000 года была сформирована процедура ВКК для количественных методов исследования, которая регламентируется приказами, где подробно описана процедура проведения КК [81, 86, 19, 14]. В этих документах предусматривается повсеместное внедрение ВКК и ВОК с помощью контрольных материалов, обеспечивающих качество аналитической стадии количественных лабораторных исследований [36].

Следует отметить, что разработанные статистические алгоритмы ВОК и ВКК существуют только для количественных биохимических исследований, хотя основную роль при обследовании населения с целью скрининга и диагностики инфекционных заболеваний, в том числе кори и краснухи, играет ИФА – метод, основанный на выявлении в образцах сыворотки крови антител класса М и G как количественным, так и качественным способом. При этом диагностическая информативность иммуноферментных тестов, состоящих из отдельных этапов (получение пробы, подготовка пробы, проведение стадий анализа, измерение и обработка аналитического сигнала, построение калибровочной кривой) зависит как от качества используемых наборов реагентов, а они относятся к группе потенциального риска применения — класс 2б [17], так и квалификации медицинского персонала лабораторий [22].

В 2004 году Бобковой М.Р. с соавторами была обоснована необходимость систематического ВКК результатов неколичественного анализа, были приведены критерии и нормативы показателей проведения исследований. Авторы предложили использовать два пула сывороток разного

уровня оптической плотности (ОП) и проведение оперативного контроля с построением контрольных карт для оценки правильности результатов [8]. Другие авторы в 2009 году предложили использование 2-х образцов ВКК с низким показателем ОП, один из которых, близкий к значению пороговой величины (cut-off), используется для определения чувствительности тест-систем [216].

Один из подходов использования ВКК скринингового ИФА-тестирования основан на использовании принципов, разработанных для количественных тестов. Этот подход реализован в рекомендациях компании АО «Вектор Бест» и ЗАО «Диагностические системы» для КК HBsAg, ВГС, сифилис, ВИЧ [48, 49]. В качестве количественного параметра в этом методе используется коэффициент позитивности (КП). Полученные результаты контрольных измерений наносятся на оперативную карту, где оценивается отклонение полученного результата от контрольного измерения для выявления случайных и систематических ошибок согласно правилам Вестгарда, описанных в приказе [86].

При отсутствии контрольных материалов некоторые исследователи предлагают проведение ВКК неколичественных методов с построением р-карты с частотой выявления маркеров инфекционных заболеваний путем нормирования, согласно ГОСТ Р 50779.42-00 [14, 51]. Однако откликов на предложенную методику в доступной литературе найти не удалось.

1.3.3. Опыт проведения внешней оценки качества и внутрилабораторного контроля качества.

ВОК определяется как объективная сравнительная оценка правильности результатов нескольких лабораторий, осуществляемая внешней организацией. В качестве контрольного материала для ВОК могут быть использованы предварительно лиофилизированные и разведенные образцы и/или сыворотки.

Первыми, ввиду особой медико-социальной значимости ВИЧ-инфекции, в РФ с 2001 года были проведены сравнительные испытания тест-систем для

скрининга населения на ВИЧ-инфекцию [64, 84]. На основе разработанных региональных программ ВОК и использования контрольной панели образцов аналогичная работа проводилась в скрининговых лабораториях Московской области по диагностике антител к ВИЧ в сыворотке крови с 2000 по 2006 год. По итогам этой многолетней работы достоверность результатов определения анти-ВИЧ увеличилась с 80 (I цикл) до 98,1% (VI цикл) [32].

С 2007 года стали появляться работы по КК социально значимых инфекций в РФ. Разработанная методика ВОК Ротановым С.В. позволила выявить слабые места в лабораторной диагностике сифилиса в специализированных учреждениях РФ. Выявление источников ошибок и их устранение привело к достижению более качественного уровня исследований, что в конечном итоге способствовало улучшению диагностики сифилиса. По итогам работы были разработаны и утверждены СОПы [63, 90, 91, 92].

Аналогичные исследования проводила группа авторов из Китая, которая с использованием разработанной панели оценила большой ассортимент разных по специфичности тестов для диагностики сифилиса. Результатом исследований стала надежность полученных данных за счет эффективного использования стандартов ВОК [201].

В рамках программы ВСФОК для оценки тест-систем используются панели зашифрованных сывороток: так, с 2013 г. определение краснушных IgG с помощью ИФА, проводится согласно инструкции «Иммуносерологические исследования сыворотки крови на выявление антител IgG к вирусу краснухи методом ИФА в сыворотке крови», в которой предусмотрено использование 8 контрольных образцов с последующим расчетом коэффициента позитивности [3]. О необходимости использования ВОК свидетельствуют и данные по тиреоидной панели [95]. Введение ВОК привело к стандартизации лабораторных методов и большей стабильности результатов ИФА, используемого для серодиагностики коклюша, после внедрения контрольной сыворотки ВОЗ и интерпретации результатов в МЕ/мл. Это позволило сравнивать результаты разных лабораторий,

использующих реагенты разных производителей [227]. О необходимости создания системы мер по управлению КК в клиничко-диагностических лабораториях, где проводятся биохимические, иммунологические, гематологические исследования отмечают в своих статьях Николаев Н.С. с соавторами и Остроумова М.Н. с соавторами. Авторы наглядно доказывают возможность минимизации ошибок на всех этапах лабораторного исследования [52, 61]. А Мошкин А.В. с соавторами предлагает алгоритм определения требований к аналитическому качеству с использованием методологии «Шесть сигм» [46]. Другие авторы предлагают свою концепцию проведения контроля качества с использованием альтернативных методов, например, использовать частоту встречаемости аналита в случае, когда нет контрольных материалов [50].

При определении IgG к вирусу краснухи Канадская национальная микробиологическая лаборатория совместно с Канадской сетью лабораторий общественного здравоохранения инициировали масштабное исследование для оценки целесообразности использования стандартизированных контрольных материалов в системе ВКК в качестве контроля тест-систем и оценки работы операторов лаборатории. Результаты измерения в течение определенного периода времени, наносились на контрольные диаграммы Леви-Дженнинга [44] для отдельных лабораторий, серий реактивов и анализировались ретроспективно международными эталонными стандартами ВОЗ: первый международный стандарт для иммуноглобулина против вируса краснухи человека (RUBI-1-94) и первый международный стандарт на иммуноглобулин против вируса гепатита В (W1042). Концентрации IgG к вирусу краснухи составляла 7,2 МЕ / мл. Количественный уровень 10 МЕ/мл IgG к вирусу краснухи, измеренный в образце сыворотки, является отсечкой (границей между отрицательным и положительным уровнем антител). При анализе полученных данных многие результаты «вышли из-под контроля» и варьировали от 5,6% до 10% с выбросом в 20,3% при межлабораторном сравнении и с 1,1% до 5,6% с выбросом в 13,4% по правилам 3-SD. В

результате были обнаружены значительные расхождения как внутри- и так в межлабораторных сравнениях тест-систем, связанные с работой персонала лабораторий, а не с партиями наборов [218].

Актуальность разработки и адаптации контрольных препаратов при определении серологических маркеров коревой и краснушной инфекций методом ИФА определяется необходимостью оптимизации мероприятия по элиминации этих инфекций. На основании распоряжения Правительства РФ N 523р [89] из федерального бюджета были выделены ассигнования в рамках участия РФ в инициативе ВОЗ по элиминации кори и краснухи для проведения научно-практических исследований, частью которых стала разработка контрольных материалов. По заданию ФБУН «МНИИЭМ им.Г.Н. Габричевского» на производстве ЗАО «Вектор БЕСТ» были приготовлены ВКК, содержащие антитела к вирусам кори/краснухи и отрицательная донорская сыворотка (ОДС). Согласно паспортным данным, образцы ВЛК, которые представляют собой лиофилизированную сыворотку крови человека, содержащую IgG к вирусу кори («ВЛК Корь-IgG»), содержащую IgG к вирусу краснухи («ВЛК Рубелла-IgG») получены от доноров, инактивированны прогреванием (56°C в течение 1 часа), стабилизированны с помощью смеси сахарозы (5%) и консерванта ProClin-3000. Препараты не содержат HBsAg, антител к ВГС, *T.Pallidum*, ВИЧ-1,2, антиген р24 ВИЧ-1[41, 111].

Контрольные препараты были охарактеризованы в лаборатории ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» и введены в работу 20 лабораторий в рамках проводимых диагностических исследований, осуществляемых путем определения одного из маркеров коревой и краснушной инфекций – антител класса IgM [38], что позволило скоординировать полученные результаты, проводимые в 20 лабораториях, и правильно интерпретировать их. Актуальность использования контроля при выявлении антител класса IgM особенно важна, поскольку выявление антител этого класса в низких значениях или в серой зоне позволяет своевременно выявить заболевшего корью). Однако, в связи с вовлечением в эпидемический процесс ранее

привитых взрослых, ВОЗ было рекомендовано определение и другого маркера этих инфекций – IgG [300], для определения которого необходимо использование контрольных препаратов, адаптация их не только к используемым диагностическим тестам, но и наборам для определения популяционного иммунитета населения [45]. Так же необходимо исследовать популяционный иммунитет к вирусу краснухи.

ГЛАВА 2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования

Материалами исследований служили сыворотки крови здоровых людей разного возраста, больных корью и привитых от кори. Было проведено 3 этапа исследования гуморального иммунитета к вирусам кори и краснухи.

На первом этапе были протестированы сыворотки крови от 654 случайно выбранных условно здоровых жителей Москвы и Московской области с неизвестным прививочным анамнезом в возрасте от 0 до 60 лет, обращавшихся в консультативно-диагностический центр (КДЦ) ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского для обследования состояния своего здоровья, и от 646 больных корью из Москвы и Московской области на наличие антител класса G к вирусу кори. Серологическое подтверждение коревой инфекции у пациентов (наличие коревых IgM-антител) было проведено методом ИФА согласно алгоритму дифференциальной диагностики [37] и рекомендациям ВОЗ [85, 287] на базе ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москва». Биоматериал от здоровых и больных людей собирали в течение 2013 года (неблагоприятная эпидемическая ситуация на обследованной территории) и хранили при -70°C . Обследованные лица были разделены на следующие возрастные группы: до 1 года, 1-2 года, 3-6 лет, 7-14 лет, 15-17 лет, 18-30 лет, 31-40 лет, 41-50 лет и 51-60 лет. Обследованные подписывали информированное согласие на взятие биоматериала для исследования и обработку персональных данных. Количественный состав групп представлен в таблице 2.1.

Таблица 2.1 - Возрастной состав обследованных групп

Возраст, год	до 1 года	1-2	3-6	7-14	15-17	18-30	31-40	41-50	51-60
Здоровые	88	34	94	113	48	87	64	64	62
Больные корью	38	70	52	55	11	181	156	66	17

На втором этапе для более детального изучения особенностей гуморального иммунитета к вирусам кори и краснухи в возрастной группе 18-30 лет были исследованы сыворотки крови от 100 условно здоровых человек в возрасте 18-30 лет. Выявленные серонегативные к вирусу кори были вакцинированы от кори и через 6 недель после вакцинации сыворотки крови от этих привитых были проанализированы на предмет формирования поствакцинального гуморального иммунитета. Работа была одобрена локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, обследованные подписывали информированное согласие на участие в исследованиях, вакцинацию и обработку персональных данных. Исследования проводились с сентября по декабрь 2018 г. Перед включением в исследование собирался прививочный анамнез пациента. В ходе исследования каждый пациент проходил клинико-лабораторное обследование в соответствии со схемой (см. табл.2.2).

Таблица 2.2 - График исследования

Параметры	Скрининг	Контрольные обследования	
		2 визит + вакцина	Через 6 нед. 3 визит
Процедура	1 визит	2 визит + вакцина	Через 6 нед. 3 визит
Получение информированного согласия	X	X	
Общие данные (анамнез)		X	
Выявление субъективных жалоб пациента	X	X	X
Врачебное обследование	X	X	X
Серологическое исследование	X		X
Общий анализ крови	X		
Данные о побочных эффектах и нежелательных проявлениях		X	X
Заключительная оценка			X

К сожалению, не все первоначально включенные в исследование прошли его полностью от начала и до конца. Часть людей, по ряду объективных причин, выбыли из исследования на разных этапах (Таблица 2.3)

Таблица 2.3 - Распределение обследованных людей по продолжительности их участия в программе наблюдения.

Этапы обследования	Количество испытуемых, прошедших обследование
Первичное обследование	100
Из них подлежали вакцинации	68
Из них вакцинированы	61
Из них обследованы: через 6 недель после прививки.	50

На третьем этапе для сопоставления особенностей специфического гуморального иммунного ответа на вирус кори у взрослых больных и привитых от этой инфекции, были исследованы сыворотки крови от 50 взрослых больных корью в возрасте от 20 до 55 лет, находившихся на стационарном лечении в коревом отделении 2-ой инфекционной больницы г. Москвы с февраля по апрель 2019 г. (зав. отделением Вдовина Е.Т.). У всех больных диагноз был подтвержден клинически и лабораторно по наличию противокоревых IgM-антител к кори. Группу сравнения составили сыворотки крови, полученные от 50 изначально серонегативных к вирусу кори условно здоровых взрослых, сопоставимых по возрасту, привитых от кори в прививочном кабинете ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, через 6 недель после прививки. Все обследованные лица подписывали информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных.

В таблице 2.4. представлены данные о суммарном количестве выполненных тестов.

Таблица 2.4 - Количество выполненных лабораторных исследований.

Наименование теста	Количество выполненных анализов	Количество исследованных параметров в рамках данного теста
Клинический анализ крови с подсчетом формулы лейкоцитов	100	1200
Определение специфических антител к антигенам кори классов М, А и G	1550	4650
Определение специфических антител к антигенам краснухи классаG	1400	1400
Определение субклассов специфических IgG-антител к антигенам вирусов кори.	150	600
Определение авидности специфических антител.	846	1692
Итого:	4046	9542

2.1.1 Сбор и обработка проб крови

Взятие крови у всех обследованных осуществляли из локтевой вены в количестве 6 мл в пробирки с гелем Vacutainer® однократно у больных корью и здоровых разного возраста и двукратно у 100 здоровых в возрасте 18-30 лет до вакцинации и через 6 недель после вакцинации. Крови позволяли свернуться и центрифугировали при 1000g и 4°C 10 мин. Полученные образцы сыворотки крови разливали по 200 мкл в пробирки типа «Эппендорф», немедленно замораживали и хранили до использования при -70°C. Сыворотку крови больных корью получали на 4-6 день после появления сыпи и тестировали в течение 72 часов согласно рекомендациям ВОЗ и приказу по элиминации кори и краснухи [37, 85, 287]

2.2 Вакцины и препараты

2.2.1 Вакцина

В работе была использована вакцина коревая культуральная живая, которая выпускается в виде лиофилизата (однородная пористая масса светлорозового цвета) для приготовления раствора для подкожного введения

(восстановленный препарат – прозрачная жидкость розового цвета). Одна прививочная доза препарата (0,5 мл) содержит 1000 тканевых цитопатических доз (ТЦД50) штамма Л-16. Производитель: НПО «Микроген», Россия.

2.2.2 Контрольные материалы

«ВЛК Корь-IgG» (лиофильно высушенный препарат, содержащий IgG к вирусу кори) и «ВЛК Рубелла-IgG» (лиофильно высушенный препарат, содержащий IgG к вирусу краснухи).

Все контрольные образцы были изготовлены на основе сыворотки крови, стабилизированной (с помощью смеси сахарозы (до 5%) и консерванта ProClin-3000) инактивированной прогреванием (56 °С в течение 1 часа) сыворотки крови человека; не содержат HBs-антиген и р24 HIV-1-антиген и антител к HCV, T. pallidum, HIV-1,2, лиофильно высушены. Все выше перечисленные контрольные образцы были изготовлены по техническому заданию ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского в 2014 году на конкурсной основе в компании ЗАО «Вектор-Бест».

«ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG» предназначен для оценки воспроизводимости исследований по выявлению антител класса G к вирусу кори и краснухи соответственно в лабораториях для диагностики *invitro*. Использование ВЛК позволяет выявить ошибки при постановке иммуноферментного анализа.

Согласно инструкциям по применению в каждый флакон с лиофилизированным образцом сыворотки «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG» одноразовым наконечником вносили по 0,2 мл дистиллированной воды. Содержимое флакона тщательно перемешивали до полного растворения образца и выдерживали при температуре 18-25°С не менее 15 мин. Восстановленные образцы хранили при температуре +2 до +8 °С в течение четырех недель или температуре (-20±2)°С в течение 3 месяцев. Допускается однократное размораживание восстановленных сывороток. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

Согласно паспортным данным для «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG»:
 Срок годности лиофилизированного образца: 5 лет, при температуре 2-8°C.
 Остаточная влажность <3 %, определено термогравиметрическим методом.
 Состав набора: 16 флаконов
 Объем расфасовки: объем дистиллированной воды для восстановления – 0,2 мл, точность фасовки - ±5%.
 Величина межфлаконной вариации – не более 8%.
 Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8°C.
 Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 2 месяцев.

Таблица 2.5 - Характеристика образцов ВЛК, содержащих иммуноглобулины класса G к вирусу кори

«ВектоКорь-IgG»серия 73				
ОП _{крит.} = 0,092				
№ образца	ОП _{ср.} * p<0,05	КП _{ср.} ** p<0,05	КВ, %***	Результат
1	0,811±0,132	9,0±2,1	7,4	Положительный

Примечания:

*ОП_{ср.} – средняя величина оптической плотности и доверительный интервал её значений, полученные при проведении 24 измерений для каждого образца.

**КП_{ср.} - средняя величина коэффициента позитивности (ОП_{обр.}/ОП_{крит.}) и доверительный интервал его значений, полученные при проведении 24 измерений для каждого образца.

***КВ – коэффициент вариации.

Таблица 2.6 - Характеристика образцов ВЛК, содержащих иммуноглобулины класса G к вирусу краснухи

«ВектоРубелла-IgG»серия 258				
ОП _{крит.} = 0,484				
№ образца	ОП _{ср.} * p<0,05	КП _{ср.} ** p<0,05	КВ, %***	Результат
1	1,702±0,215	3,5±0,9	7,5	Положительный

Примечания:

*ОП_{ср.} – средняя величина оптической плотности и доверительный интервал её значений, полученные при проведении 24 измерений для каждого образца.

**КП_{ср.} - средняя величина коэффициента позитивности (ОП_{обр.}/ОП_{крит.}) и доверительный интервал его значений, полученные при проведении 24 измерений для каждого образца.

***КВ – коэффициент вариации.

2.3 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.3.1 Определение количества специфических иммуноглобулинов классов IgM и IgG.

Антитела классов IgM и IgG к вирусу кори и краснухи в сыворотке крови определяли методом ИФА с помощью тест-систем «ВектоКорь-IgM», «ВектоКорь-IgG», «ВектоРубелла-IgG» (производитель «Вектор-Бест», Россия), зарегистрированных и разрешенных к применению на территории РФ.

Все использованные наборы имеют единый протокол проведения иммуноферментного анализа. Для проведения ИФА все исследуемые образцы необходимо было развести в 10 раз раствором для предварительного

разведения сывороток. Для этого вносили в лунки вспомогательного планшета по 90 мкл раствора и добавляли по 10 мкл цельной сыворотки и тщательно перемешивали. При разведении сыворотки (плазмы) красный цвет раствора для предварительного разведения должен измениться на желтый. Если изменения цвета не происходило, то согласно инструкции к набору, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат. Этот образец разводили повторно, чтобы исключить ошибку.

Готовили промывочный раствор из 25-кратного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином в соответствии с таблицей расхода компонентов. Конъюгат (моноклональные антитела к IgG или к IgM человека, меченные пероксидазой хрена), контрольные и калибровочные образцы, раствор тетраметилбензидина (ТМБ) в используемых нами наборах готовы к применению.

После подготовки всех реагентов и предварительного разведения сывороток проводили иммуноферментный анализ. Калибраторы и контрольные образцы вносили по 100 мкл в лунки, согласно протоколу эксперимента, в остальные лунки вносили по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл исследуемых образцов из планшета с предварительным разведением сывороток. Далее планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 30 мин при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в термостате. По окончании инкубации снимали липкую пленку и удаляли содержимое лунок в сосуд с дезинфицирующим раствором. Планшет промывали промывочным раствором по 400 мкл в каждую лунку на вошере Wellwash 4 Mk2 (Labsystems, Финляндия) 5 раз и вносили во все лунки планшета по 100 мкл конъюгата, планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 30 мин при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в термостате. По окончании инкубации промывали на вошере 5 раз, как описано выше и вносили во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Планшет инкубировали в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25°C . Далее вносили во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ по 100 мкл

стоп-реагента. Интенсивность окраски определяли с помощью микропланшетного спектрофотометра MultiskanEX (ThermoLabsystems, Финляндия) при длине волны 450 нм против 630 нм.

Оценку специфической активности сывороток осуществляли, согласно инструкции производителя:

- при определении IgM – по величине оптической плотности в оптических единицах (о.е.). Основными критериями достоверности получаемых результатов являются выполнение следующих условий: ОП отрицательного контрольного образца не более 0,25 о.е., ОП контрольного положительного образца не менее 1,0 о.е.

- IgG в наборе «ВектоКорь-IgG» – по концентрации коревых антител в МЕ/мл. Для этого на основании ОП калибровочных тестовых образцов, содержащих коревые IgG в концентрации: 0,0; 0,15; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 МЕ/мл, строили калибровочный график зависимости «ОП (о.е.) – концентрация (МЕ/мл)». Основными критериями достоверности получаемых результатов являются:

- соответствие полученной концентрации IgG в тестовом КО диапазону значений, указанному на этикетке флакона КО или в паспорте к набору;

- выполнение следующих условий: $ОП_0 \leq 0,2$ о.е.; $ОП_5 \geq 1,0$ о.е., где: ОП₀ и ОП₅ являются средними значениями оптической плотности в лунках с калибровочными образцами 0 и 5 МЕ/мл соответственно.

- IgG в наборе «ВектоРубелла-IgG» – по концентрации краснушных антител в МЕ/мл. Для этого на основании оптических плотностей калибровочных образцов, содержащих известные количества IgG в концентрации к вирусу краснухи 0; 10; 50; 100; 200 МЕ/мл, аттестованные относительно WHO International Standard AntiRubella Immunoglobulin, Human, NIBSCcode: RUBI-1-94; строят калибровочный график зависимости «ОП (о.е.) – концентрация (МЕ/мл)». Основными критериями достоверности получаемых результатов являются:

-соответствие полученной концентрации IgG в КО диапазону значений, указанному на этикетке флакона КО или в паспорте к набору;

- выполнение следующих условий: $ОП0 < 0,2$ о.е.; $ОП5 > 1,0$ о.е., где: ОП0 и ОП5 являются средними значениями оптической плотности в лунках с калибровочными образцами 0 и 200 МЕ/мл соответственно.

Учет результатов количественного определения проводить в том случае, если содержание IgG к вирусу краснухи в контрольном образце соответствует указанному диапазону концентраций на этикетке флакона и выполнены следующие условия:

– соотношение средних арифметических значений оптических плотностей калибровочных образцов: $ОП0 < ОП10 < ОП50 < ОП100 < ОП200 < ОП800$;

– $ОП0 \leq 0,1$ о.е.; (при регистрации на длине волны 450 нм)

– $ОП200 \geq 1,5$ о.е. (при регистрации на длине волны 450 нм);

Исследуемый образец сыворотки (плазмы) крови считать отрицательным, если концентрация IgG к вирусу краснухи в нем менее 10 МЕ/мл.

Исследуемый образец сыворотки (плазмы) крови считать положительным, если концентрация IgG к вирусу краснухи в нем более или равна 10 МЕ/мл.

Исследуемый образец сыворотки (плазмы) крови считать отрицательным, если концентрация IgG к вирусу кори в нем менее 0,12 МЕ/мл.

Исследуемый образец сыворотки (плазмы) крови считать положительным, если концентрация IgG к вирусу кори в нем более 0,18 МЕ/мл.

Интервал 0,12-0,18 МЕ/мл – серая зона, результат следует расценивать как сомнительный.

Защитным уровнем IgG для кори считали показатель 0,2 МЕ/мл [267, 268], для краснухи - 25 МЕ/мл. Условное разделение обследуемых лиц на

группы с поствакцинальным и постинфекционным иммунитетом осуществляли по величине содержания IgG (МЕ/мл) [66]. При этом позитивное значение концентрации специфических IgG к вирусу кори менее 1,0 МЕ/мл (для противокоревых антител) считалось показателем поствакцинальной реакции, тогда как более высокие показатели свидетельствовали о перенесенной инфекции. Для краснухи таким пороговым значением считалось 200 МЕ/мл.

2.3.2 Проведение внутрилабораторного контроля качества скрининговых исследований

В руководстве ВОЗ по лабораторной диагностике кори и краснухи для «домашнего контроля» предлагают выбрать образец сыворотки, объем которого будет достаточным, которого хватит для использования каждые 2 - 4 недели в течение 12 месяцев [288]. Представление полученных результатов ОП контрольных сывороток, входящих в тест-систему, и «домашних контролей» в графической форме позволит легко следить за стабильностью выполнения ИФА в каждой лаборатории, быстро обнаруживать проблемы, а также оценивать деятельность каждого оператора. Согласно Российскому приказу № 45 [81], необходимо проводить внутрилабораторный контроль качества с использованием контрольных материалов. ВКК применяют для оценки внутри- и межсерийной сходимости (далее сходимость и воспроизводимость) анализа. В данной работе использовали «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG».

2.3.3 Определение специфических Ig A и субклассов специфических IgG

Субклассы специфических IgG-антител определяли методом ИФА в модификации [120]. Были использованы 96-луночные планшеты, с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антигенами кори от коммерческого набора «ВектоКорь-IgG». Сыворотки вносили в разведении 1:100. В качестве конъюгата использовали меченные пероксидазой

моноклональные антитела к IgG1 (клон 10G/2C11), IgG2 (клон 23G/3C7), IgG3 (клон 22G/5G12) и IgG4 (клон 20G/5C7) или IgA (ООО «Полигност», Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Для определения специфических IgA-антител также использовали 96-луночные планшеты, с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок антигенами кори от коммерческого набора «ВектоКорь-IgG», поскольку нет сертифицированных наборов для определения противокоревых IgA-антител, а вместо IgG-конъюгата применяли меченные пероксидазой анти-IgA моноклональные антитела (ООО «Полигност», Россия). Предварительно отработали разведение конъюгата, оптимальной была выбрана концентрация 1 мкг/мл. После инкубации и повторной отмывки – вносили субстрат, содержащий ТМБ. Интенсивность окраски определяли с помощью микропланшетного спектрофотометра MultiskanEX (ThermoLabsystems, Финляндия) при длине волны 450 нм против 630 нм. Для сопоставления результатов различных опытов использовали стандартную сыворотку, содержащую специфические антитела к вирусу кори всех четырех субклассов IgG или IgA. Результат выражали в процентах от общего специфического IgG. IgA выше 0,2 МЕ/мл оценивали как положительные.

2.3.4 Определение avidности специфических антител.

Для определения индекса avidности в исследуемых сыворотках использовали зарегистрированную и разрешенную к использованию в РФ тест-систему «Avidity:Anti-MeaslesVirusesELISA/IgG» фирмы Euroimmun (Германия). Для проведения реакции необходимо было развести сыворотки пациентов в 101 раз буфером для разведения образцов. Для этого 10 мкл сыворотки добавляли в 1 мл буфера. Контроли, конъюгат, раствор мочевины, субстратный буфер были готовы к применению. В набор входит положительный контрольный образец, содержащий высокоавидные антитела класса IgG к вирусу кори, и положительный контрольный образец, содержащий низкоавидные антитела класса IgG к вирусу кори.

- На первой стадии вносили по 100 мкл контролей и разведенных образцов пациентов в дублях в отдельные лунки микропланшета. Далее планшет

инкубировали при комнатной температуре (от+18 °С до+ 25 °С) в течение 30 минут. По окончании инкубации планшет промывали на вошере Wellwash 4 Mk2 (Labsystems, Финляндия) 5 раз согласно инструкции к набору.

- На второй стадии вносили в каждую лунку первого, третьего, пятого и т.д. стрипа по 200 мкл раствора мочевины и по 200 мкл фосфатного буфера в каждую лунку второго, четвертого, шестого и т.д. стрипа. Инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре (от+18 °С до+ 25 °С). По окончании инкубации планшет промывали на вошере 5 раз согласно инструкции к набору.

- на третьей стадии вносили в каждую лунку по 100 мкл ферментного конъюгата (меченные пероксидазой антитела к IgG человека). Инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре (от+18 °С до+ 25 °С). По окончании инкубации планшет промывали на вошере 5 раз согласно инструкции к набору.

- На четвертой стадии вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора хромогена/субстрата. Инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре (от+18 °С до+ 25 °С).

- На пятой стадии добавляли в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента (в той же последовательности и с такой же скоростью, как вносился раствор хромогена/субстрата). Далее проводили фотометрическое измерение интенсивности окрашивания раствора в лунках при основной длине волны 450 нм и при длине волны сравнения между 630 нм в течение 30 минут после добавления стоп-реагента на микропланшетном спектрофотометре MultiskanEX (ThermoLabsystems, Финляндия). Положительные контроли антител с низкой и высокой авидностью выполняют роль внутренних контролей для проверки правильности процедуры тестирования. Их следует использовать при каждой постановке анализа. Авидность IgG оценивали по проценту диссоциации специфических иммунных комплексов согласно инструкции производителя.

Присутствие в сыворотке крови пациента антител с низкой avidностью считается установленным, если величина ОП в значительной степени снижается после обработки раствором мочевины. Для получения объективных результатов рассчитывают индекс относительной avidности (RAI), который выражают в процентах, используя величины ОП образца после и без обработки мочевиной:

$$RAI = \frac{\text{ОП образца, обработанного мочевиной}}{\text{ОП образца, необработанного мочевиной}} \times 100$$

ОП образца, необработанного мочевиной

Верхняя граница интервала антител с низкой avidностью (уровень отсечения, cut-off), рекомендованная фирмой EUROIMMUN, соответствует RAI, равному 40%. Меньшие значения RAI рассматриваются как указание на присутствие антител с низкой avidностью. Значения RAI между 40% и 60% рассматриваются как пограничные. Значения, превышающие 60% указывают на присутствие антител с высокой avidностью. Если полученный результат классифицируется как пограничный, рекомендуется не ранее, чем через 7 дней, взять второй образец и протестировать его одновременно с первым образцом.

RAI < 40%: Указание на присутствие низкоавидных антител

RAI 40-60%: Пограничный результат

RAI > 60%: Указание на присутствие высокоавидных антител

Достоверные результаты измерения avidности IgG антител могут быть получены только в том случае, если в образце пациента содержится диагностически значимое количество специфических антител. Как правило, определение индекса avidности в образцах, ОП которых без обработки мочевиной < 0,140, нецелесообразно.

Разделение гуморального иммунного ответа на первичный и вторичный тип иммунного ответа, осуществляли по спектру субклассов и avidности IgG. Для первичного типа иммунного ответа характерно преобладание низкоавидных (менее 40%) специфических антител IgG3-субкласса, при

вторичном типе иммунного ответа преобладают высокоавидные (более 80%) антитела [39, 113, 117].

2.3.5 Методы математической обработки полученных результатов.

Для каждого параметра была исследована статистическая гипотеза о нормальности распределения данных по критерию о равенстве дисперсий. В случае если гипотеза не была подтверждена, полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с вычислением медианы, первой и третьей квартилей (Me (LQ-NQ)). Для непараметрических методов применяли U-критерий Вилкоксона. В случае подтверждения нормальности распределения признака использовали параметрическую статистику с вычислением средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm SE$). Для сопоставления групп применяли t-критерий Фишера-Стьюдента. Уровень $p < 0,05$ считали значимым.

Для оценки сходимости и воспроизводимости результатов измерений «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG», построения контрольных карт использовали параметры вариационной статистики согласно ГОСТ Р 53133.1-4-2008, часть 2 [18, 144]. Для расчета среднего значения ($X_{ср}$) (1), среднеквадратичного отклонения (S) (2), коэффициента вариации (CV) (3) образцов «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG» использовали формулы:

$$X_{ср} = (\sum X_i)/n \quad (1)$$

$$S = \sqrt{(\sum (X_i - X_{ср})^2)/n-1} \quad (2)$$

$$CV = s/X_{ср} \times 100\%, \quad (3)$$

Где:

X_i - значения измерений ОП (о.е.) или концентрация (МЕ/мл);

$X_{ср}$ – среднее значение ОП (о.е.) или концентрация (МЕ/мл);

S – среднее квадратичное отклонение ОП (о.е.) или концентрация (МЕ/мл);

CV - коэффициент вариации ОП (о.е.) или концентрация (МЕ/мл).

Правила построения контрольной карты.

По результатам 20 аналитических серий исследований контрольного материала рассчитывали:[81].

- среднюю арифметическую величину $\bar{X}_{ср}$,
- среднее квадратическое отклонение S ,
- контрольные пределы: $\bar{X}_{ср} \pm 1S$, $\bar{X}_{ср} \pm 2S$ и $\bar{X}_{ср} \pm 3S$,

Если в ряду результатов, полученных для одного из контрольных материалов, результатов есть значение, выходящее за пределы $\pm 3S$, то его отбрасывают и для этого материала проводят еще одну аналитическую серию, после чего снова подсчитывают значения $\bar{X}_{ср}$ и S .

Для каждого из материалов с использованием рассчитанных значений строят контрольную карту. Последняя представляет собой график, на оси абсцисс которого откладывают номер аналитической серии (или дату ее выполнения), а на оси ординат - значения определяемого показателя в контрольном материале. Через середину оси ординат проводят линию, соответствующую средней арифметической величине $\bar{X}_{ср}$, и параллельно этой линии отмечают линии, соответствующие контрольным пределам:

$\bar{X}_{ср} \pm 1S$ - контрольный предел "1 среднее квадратическое отклонение";

$\bar{X}_{ср} \pm 2S$ - контрольный предел "2 средних квадратических отклонения";

$\bar{X}_{ср} \pm 3S$ - контрольный предел "3 средних квадратических отклонения".

Расчеты проводились с использованием компьютерных программ «Statgraf», «MicrosoftOfficeExcel 2010» и «Statistica 8.0».

Оценку результатов исследования контрольных материалов проводили с использованием контрольных правил, получившим название (по имени их автора) "множественных правил Westgard" [281, 282].

1_{2S} - результат одного измерения находится за пределами ($+2S$) или ($-2S$) от среднего значения контроля ($\bar{X}_{ср}$). Это правило предупреждает о наличии случайной ошибки в данной аналитической системе.

1_{3S} - результат одного измерения находится за пределами ($+3S$) или ($-3S$) от среднего значения контроля ($\bar{X}_{ср}$).

R_{4S} - 1 вариант. Результат одного измерения (точка 5) находится на расстоянии $\geq 4S$ от предыдущего измерения (точка 4).

2 вариант. Результат одного измерения (точка 11) находится на расстоянии $\geq 4S$ от предыдущего измерения (точка 10).

4_{1S} - Результаты последовательных четырех измерений находятся по одну сторону за пределами ($+1S$) или ($-1S$) от среднего значения контроля ($X_{ср.}$).

2_{2S} - Результаты последовательных двух измерений находятся по одну сторону за пределами ($+2S$) или ($-2S$) от среднего значения контроля ($X_{ср.}$).

10_x - Результаты последовательных десяти измерений находятся по одну сторону от среднего значения контроля ($X_{ср.}$) независимо от контрольных пределов, в которых они находятся.

Контрольные правила должны проверяться в определенной последовательности. Так, если на контрольной карте обнаружено превышение одного из пределов $X_{ср} \pm 2S$ (контрольный признак 1_{2S}), то последовательно проверяют наличие контрольных признаков 1_{3S} , 2_{2S} , R_{4S} , 4_{1S} и, 10_x . Если обнаруживают хотя бы один из указанных признаков, все результаты, полученные в данной аналитической серии, считаются неприемлемыми. Проведение анализа приостанавливают, выявляют и устраняют возможные причины возникновения ошибки. При этом важно иметь ввиду, что появление контрольных признаков 1_{3S} и R_{4S} свидетельствует об увеличении случайных ошибок, в то время как признаки 2_{2S} , 4_{1S} и 10_x - об увеличении систематической ошибки методики.

После устранения причин появления погрешностей все пробы, проанализированные в этой серии (и пациентов, и контрольные), исследуют повторно. Поскольку перед этим в методику были внесены изменения, связанные с устранением причины возникновения повышенных погрешностей, контрольные результаты серии, признанной неприемлемой, и предшествующих ей серий не должны использоваться при оценке повторной и последующих серий. Так, например, в повторной серии (первой после внесения изменений в методику) могут быть использованы лишь два контрольных результата этой серии, т.е. правила 4_{1S} и 10_x , а также 2_{2S} в

приложении только к одному из двух контрольных материалов к этой серии не применимы.

Использование контрольных материалов для отслеживания изменений в аналитических характеристиках методики (в том числе по контрольным картам) предполагает, что свойства используемых материалов при этом остаются неизменными, т.е. материалы достаточно стабильны. В случае промышленно изготовленных материалов их стабильность обеспечивается и проверяется производителем. В случае же самостоятельно приготовленных контрольных материалов, таких, например, как сливная сыворотка крови, реальная стабильность материала не подвергается столь строгому контролю. Это означает, что при использовании таких материалов может проявиться вполне заметный тренд - снижение (редко – повышение) истинного значения определяемого показателя во времени, что, в конце концов, приведет к выявлению повышенной систематической погрешности методики по правилам 2_{2S} , 4_{1S} или 10_x .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСАМ КОРИ И КРАСНУХИ

3.1 Влияние особенностей коллективного иммунитета к антигенам вирусов кори и краснухи на структуру заболеваемости.

Исследованы образцы сывороток крови 654 условно здоровых жителей Москвы и Московской области разного возраста на предмет выявления у них антител к антигенам вирусов кори и краснухи. Анализ среднего уровня антител против антигенов вирусов кори и краснухи по возрастным группам выявил, что в возрастных группах старше 1 года средний уровень антител превышает уровень отсечки. Наиболее высокий уровень антител к вирусу краснухи и минимальный уровень антител к кори выявлен в возрастной группе от 18 до 30 лет (см. Таблицу 3.1).

Таблица 3.1 - Уровень противовирусных антител класса IgG (МЕ/мл) в сыворотке крови обследованных доноров в зависимости от возраста, Ме (LQ-UQ).

	до1 г (n=88)	1-2г (n=34)	3-6л (n=94)	7-14л. (n=113)	15-17л (n=48)	18-30л (n=87)	31-40л (n=64)	41-50л (n=64)	51-60л (n=62)
краснуха	5,377 (1,218- 10,392)	132,686 (2,951- 501,364)	267,661 (111,866- 493,934)	198,923 (89,908- 439,729)	322,826 (148,969- 462,888)	400,342 (200- 628,795)	345,135 (92,515- 592,922)	274,462 (161,681- 547,107)	250,056 (129,177- 539,368)
корь	0,011 (0- 0,041)	0,478 (0,065- 1,131)	0,412 (0,154- 0,847)	0,398 (0,185- 0,732)	0,287 (0,121- 0,597)	0,237 (0,104- 0,549)	0,355 (0,134- 0,973)	0,807 (0,403- 2,407)	2,182 (1,562- 3,401)

Далее были отдельно проанализированы уровни антител только в образцах сывороток от серопозитивных доноров. Из 654 исследованных образцов сыворотки крови от условно здоровых лиц антитела к вирусу кори были выявлены у 431 (65,9%) обследованных. Отрицательные результаты были получены у 223 (34,1%) лиц. При аналогичном обследовании тех же образцов сывороток крови на антитела к вирусу краснухи серопозитивными оказались 524 (80,1%) лиц, а серонегативными – 130 (19,9%). Результаты обследования

по возрастным группам представлены в таблице 3.2. В группе детей до 1 года (40 детей в возрасте от 0 до 6 месяцев и 48 детей от 0 до 12 месяцев) выявлено наличие антител к вирусу кори

Таблица 3.2 - Уровни противовирусных антител класса IgG (МЕ/мл) в образцах сывороток крови серопозитивных доноров в зависимости от возраста

Возраст	Всего	Корь			Краснуха		
		Абс.	%	Уровень IgG-антител у серопозитивных (Ме; LQ-HQ)	Абс.	%	Уровень IgG-антител у серопозитивных (Ме; LQ-HQ)
До 1 года	88	5	5,7	0,499; 0,404-0,993	16	18,2	56,53; 23,25-93,95
1-2 г.	34	20	58,8	0,617; 0,46-1,179	22	64,7	307,73; 260,46-338,14
3-6л.	94	69	73,4	0,668; 0,377-1,171	84	89,4	289,0; 210,33-357,36
7-14л.	113	92	81,4	0,62; 0,279-1,181	104	92,0	225,54; 149,69-285,59
15-17л.	48	31	64,6	0,482; 0,279-0,998	43	89,6	306,31; 284,17-440,05
18-30л	87	50	57,5	0,575; 0,403-0,967	81	93,1	481,21; 307,54-518,22
31-40л.	64	47	73,4	0,632; 0,31-1,564	54	84,4	476,43; 272,81-524,47
41-50л	64	58	90,6	1,723; 0,632-2,629	59	92,2	268,31; 189,71-312,09
51-60	62	59	95,2	2,272; 1,662-3,219	61	98,4	242,77; 143,73-414,60

(выше 0,2 МЕ/мл) только у 4 из 88 детей (4,5 %). В то же время, низкие, но положительные уровни антител к вирусу краснухи (выше 25 МЕ/мл) были выявлены у 6 из 40 детей (15,0 %) в возрасте до 6 месяцев и у 6 из 48 детей (12,5 %) в группе от 6 мес. до 1 года. По-видимому, эти антитела следует расценить, как материнские антитела. Крайне высокое значение (4,415 МЕ/мл) противокоревых антител было обнаружено у 1 ребенка из 40 (2,5 %) в возрасте 6 мес., а у 2 из 48 детей (4,2 %) в возрасте до 1 года - высокий уровень краснушных антител, что свидетельствует, по-видимому, о недавно

перенесенной инфекции. Из таблицы видно, что средний уровень антител к вирусу кори среди серопозитивных держится в интервале 0,5-0,7 МЕ/мл и резко возрастает в возрастных группах старше 40 лет, что свидетельствует, по нашему мнению о возрастании количества переболевших корью в старших возрастных группах. В то же время, при анализе антител к вирусу краснухи среди серопозитивных видно, что уровень антител держится в интервале от 200 до 500 МЕ/мл во всех возрастных группах старше 1 года и значительно превышает уровень в 25 МЕ/мл.

Структурный анализ коллективного иммунитета, выраженный в процентах лиц, имеющих специфические антитела в зависимости от возраста (Рисунок 3.1) показал, что среди младенцев до 6 мес. антитела против вирусов краснухи обнаруживаются у 15 из 40 детей (37,5%), а против вирусов кори - у 5 из 40 (12,5%).

К 1 году жизни эти показатели снижаются, антитела против вирусов краснухи обнаруживались у 8 из 48 детей (16,7 %), а против вирусов кори - у 2 из 48 (4,2 %). По-видимому, это связано с постепенным исчезновением материнских антител из кровотока детей к этому возрасту. В возрастной группе 1-2 лет антитела к антигенам вирусов краснухи были выявлены у 22 из 34 детей (64,7%) и к антигенам вирусов кори – у 20 из 34 обследованных детей (58,8%). Следует помнить, что согласно календарю вакцинации, в Российской Федерации дети именно этого возраста получают первую дозу вакцины против вирусов кори и краснухи. К возрасту 6 лет, когда проводится вторая вакцинация против вирусов кори и краснухи, антитела к антигенам вирусов краснухи были обнаружены у 84 из 94 детей (89,4%), а к антигенам вирусов кори – у 69 из 94 детей (73,4%). Уровень серопозитивных к вирусам краснухи колебался около 90% во всех последующих возрастных группах от 14 лет вплоть до возрастной группы 51-60 лет. Уровень серопозитивных к вирусам кори был максимален в возрасте 7-14 лет (92 серопозитивных из 113 детей - 81,4%), затем постепенно снижался до 57,5% (50 серопозитивных из 87) в возрастной группе 18-30 лет, у обследованных 31-40 лет этот показатель

повышался до 68% и далее колебался около 90% в последующих возрастных группах.

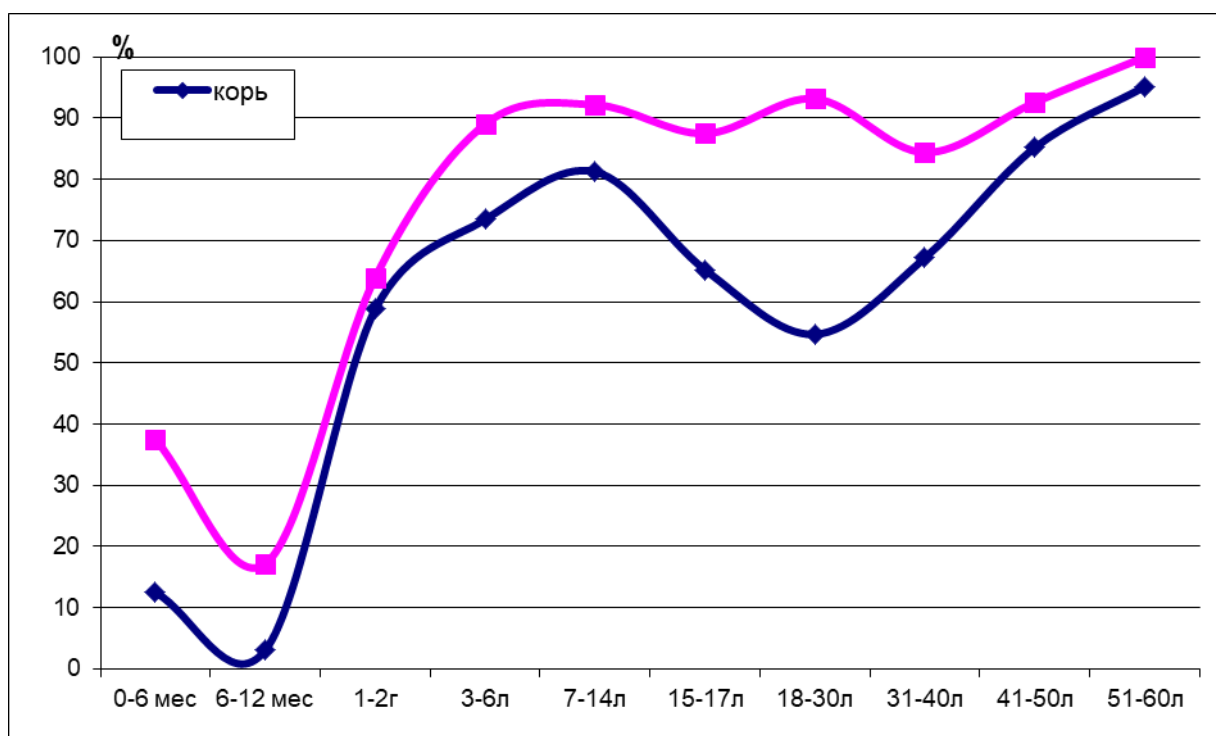


Рисунок 3.1 - Возрастная динамика процента серопозитивных к вирусам кори и краснухи.

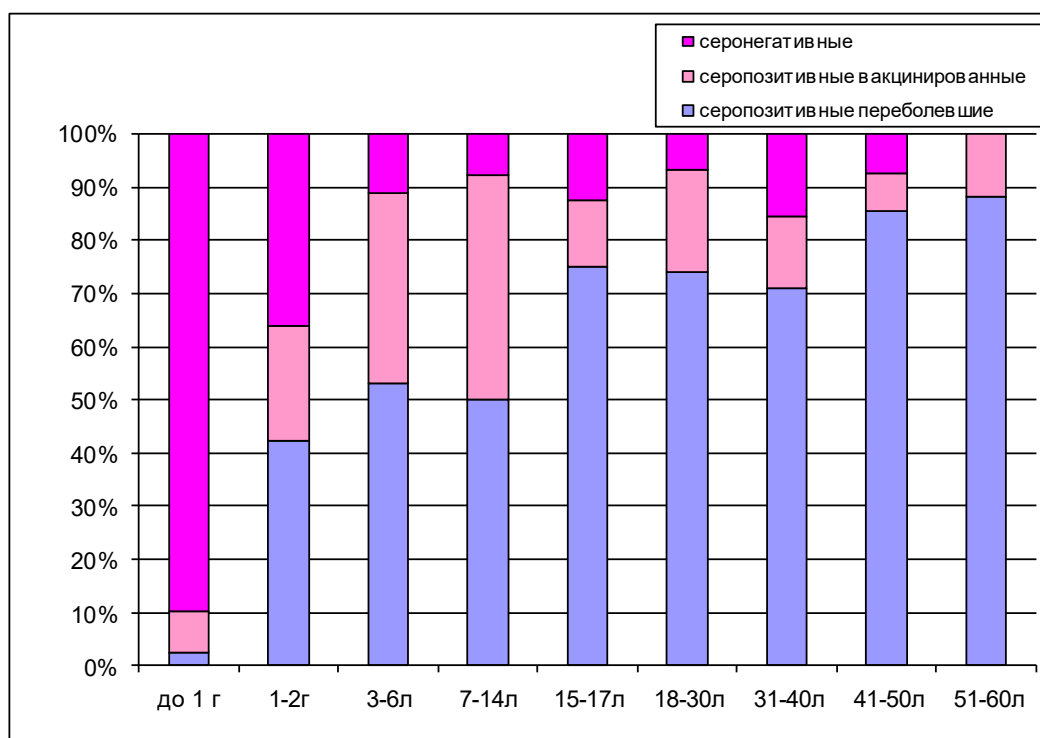
Примечание. По оси абсцисс указан возраст.

К сожалению, у обследованных лиц не были доступны сведения о прививках. Тем не менее, известно, что после перенесенной инфекции формируются специфические антитела более высокого уровня, чем после вакцинации. Для условного разделения обследуемых лиц на группы с поствакцинальным и постинфекционным иммунитетом по величине содержания IgG (МЕ/мл) использовали критерий, предложенный группой авторов [5, 6, 7, 66, 67]. При этом положительное значение концентрации специфических IgG менее 1,0 МЕ/мл (для противокоревых антител) считалось показателем поствакцинальной реакции, тогда как более высокие показатели свидетельствовали о перенесенной инфекции. Для краснухи таким пороговым значением считали 200 МЕ/мл. Основываясь на этих различиях, был проведен анализ структуры гуморального иммунитета против вирусов кори и краснухи в зависимости от способа получения (в результате вакцинации или

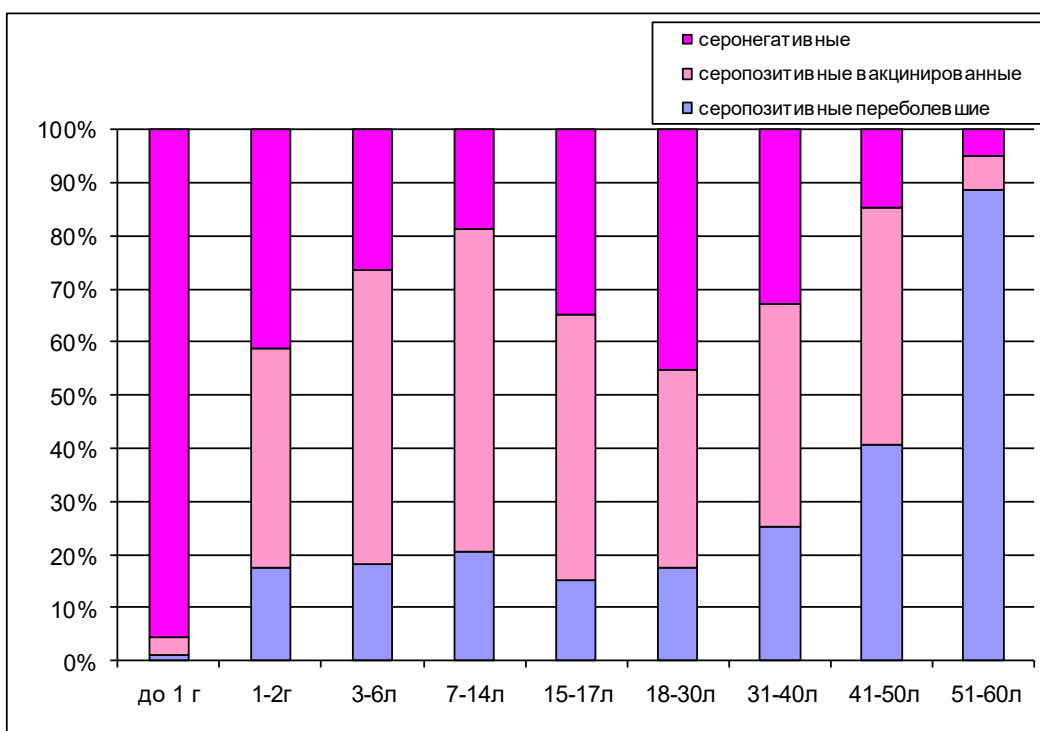
перенесенной инфекции). Был выявлен высокий процент переболевших краснухой (40-50% в детском возрасте и 70-80% у взрослых), что обеспечивает внешнее более благоприятную ситуацию с данной инфекцией, когда после 6 лет достигается плато на уровне 90% защищенных и выше (рисунок 3.2а). В возрастных группах до 30 лет процент переболевших корью (на основании лабораторных данных) составляет 15-20%, затем их доля начинает увеличиваться в более старшем возрасте (рисунок 3.2б).

Полученные на 654 обследованных результаты анализа структуры коллективного иммунитета к вирусам кори в зависимости от возраста были сопоставлены с анализом возрастной структуры заболеваемости на основании исследования сывороток крови от 646 больных корью на тех же территориях и в тот же год исследования. Для этого исследованы образцы сывороток крови от 646 больных корью жителей Москвы и Московской области методом ИФА с определением антител классов IgM и IgG. Антитела класса IgM были выявлены у всех обследованных, что служило лабораторным подтверждением диагноза. При анализе заболеваемости корью в разных возрастных группах оказалось, что основную массу заболевших составили взрослые: из 646 человек 420 взрослых (65,0%) и 226 детей (35,5 %) (таблица 3.3).

Среди детей наиболее подверженными заболеванию оказались дети 1-2-х лет (70 человек), что составило 10,8% от всех больных корью. Доля подростков в общей заболеваемости была относительно малой 11 из 646 (1,7 %). А среди взрослых (старше 18 лет) чаще других болели люди в возрастной группе 18-30 лет - 28,0% (181 из 646 заболевших). Из 420 взрослых больных 80,2% (337 человек) составили лица в возрасте 18-40 лет. Важно, что из этих 337 пациентов вторичным иммунным ответом реагировал на инфекцию 61 человек (18,1%). Следует отметить, что больные с вторичным иммунным ответом были выявлены только среди взрослых (рисунок 3.3). Так, вторичным типом иммунного ответа на вирус кори ответили: из 181 человека возрастной группы 18-30 лет 22 больных(12,2%), в группе 31-40 лет из 156 человек – 29 пациентов (18,6%), а в группе 41-50 лет из 66 человек – 10 больных (15,2%).



а



б

Рисунок 3.2 - Структура иммунитета (%) против вирусов кори и краснухи у здоровых людей в зависимости от возраста.

Примечание. а – краснуха. б – корь. По оси абсцисс – возраст в годах.

Все 226 детей и подростков, заболевших корью, ответили на инфицирование первичным типом иммунного ответа. Лиц с вторичным иммунным ответом среди детей, подростков и взрослых старше 50 лет выявлено не было.

Таблица 3.3 - Структура заболевших корью в зависимости от возраста.

Возрастные группы (годы)	Абс.	%	Возрастные группы (годы)	Абс.	%
до 1 года /	38	5,9	18-30	181	28,0
1-2	70	10,8	31-40	156	24,1
3-6	52	8,1	41-50	66	10,2
7-14	55	8,5	51-60	17	2,63
15-17	11	1,7			
Всего детей и подростков	226	35,0	Всего взрослых	420	65,0
Итого:	646 чел			100%	

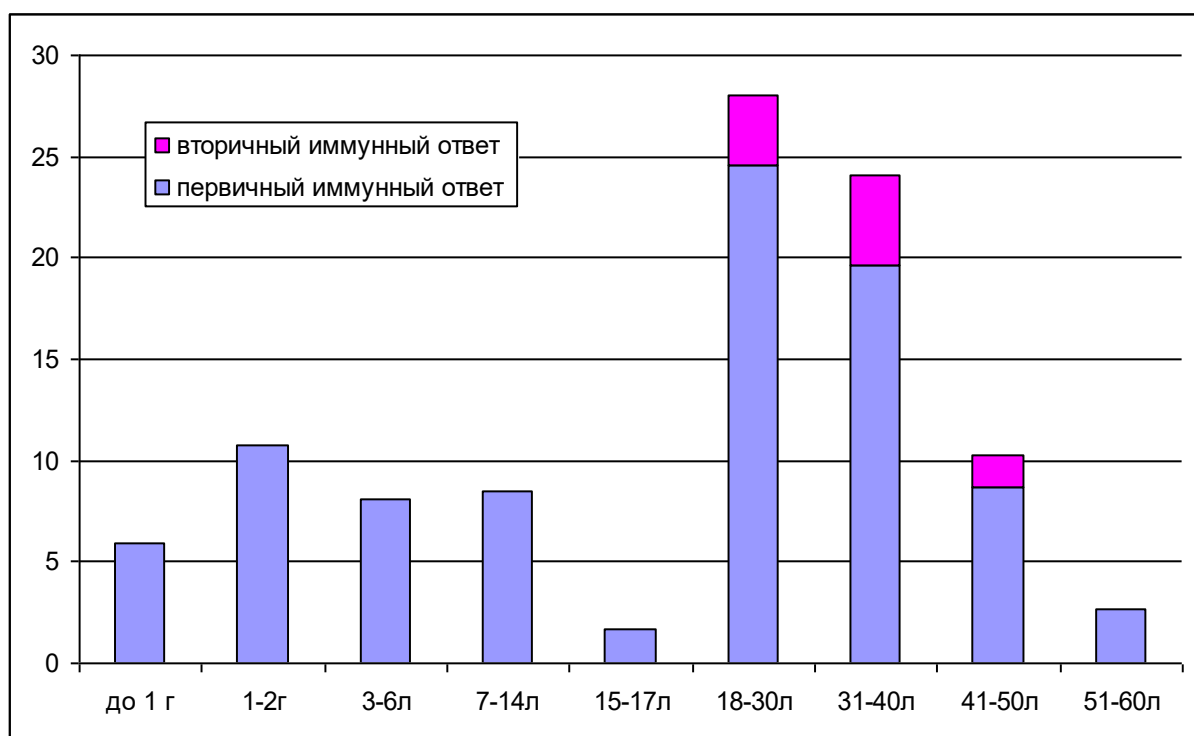


Рисунок 3.3 - Возрастная структура иммунного ответа больных корью с первичным и вторичным иммунным ответом

Примечание. По оси абсцисс – возраст в годах. По оси ординат – процент больных корью.

При сопоставлении результатов оценки возрастной структуры заболеваемости корью с долей лиц того же возраста, имеющих

противокоревые антитела в сыворотке крови (представлено на рисунке 3.4), видно, что состояние гуморального противокоревого иммунитета и заболеваемость корью сопряжены: любые изменения в уровне серопозитивных к вирусу кори лиц в возрастных группах отражаются на заболеваемости в той же возрастной группе.

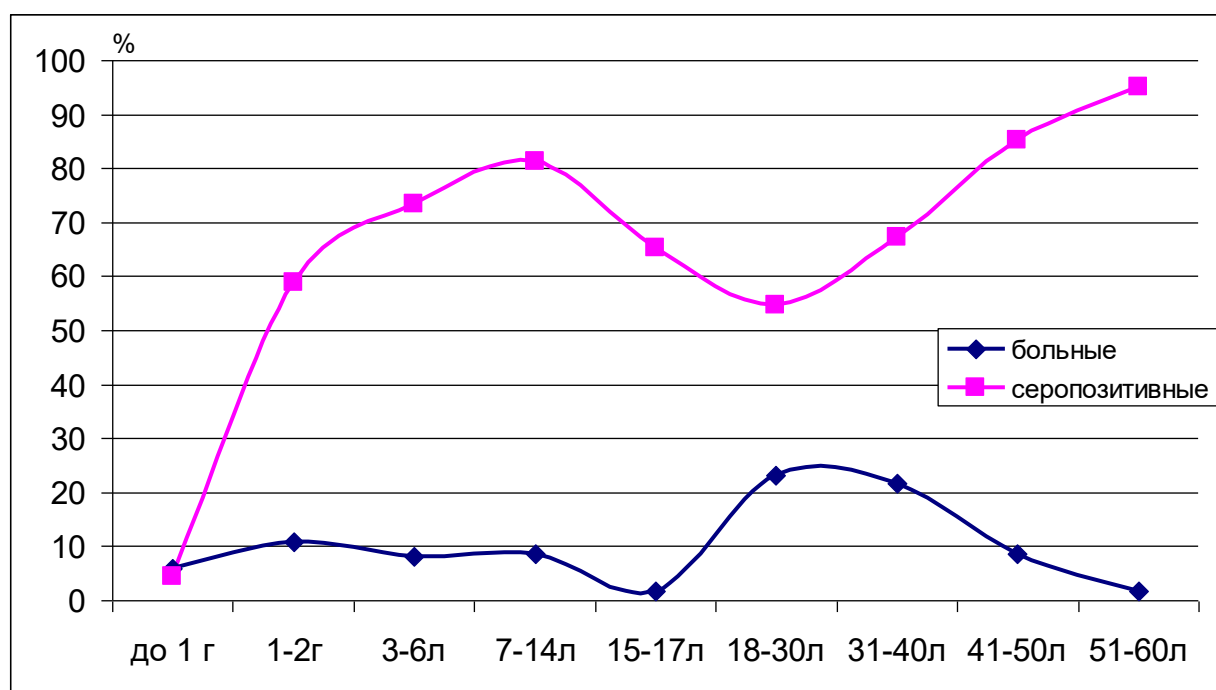


Рисунок 3.4 - Сопоставление заболеваемости корью (%) с процентом серопозитивных к вирусу кори здоровых людей, в зависимости от возраста. Примечание. По оси абсцисс – возраст в годах.

Особенно демонстративны результаты, полученные для возрастных групп 18-30 и 31-40 лет. Выявлена сильная отрицательная корреляция между заболеваемостью корью и уровнем серопозитивных к вирусу кори лиц ($r = -0,76$) в исследованных возрастных группах.

Таким образом, анализ структуры гуморального иммунитета к вирусам кори и краснухи жителей г. Москвы и Московской области выявил интересные закономерности. Если для краснухи процент серопозитивных достигает 90% к возрасту 6-7 лет, когда проводится вторая вакцинация от этой инфекции, и сохраняется на этом уровне вплоть до старшей возрастной

группы, то этот показатель для кори достигает максимума в 81,3% в возрастной группе 7-14 лет, а далее начинает прогрессивно снижаться до уровня 57,5% серопозитивных в возрастной группе 18-30 лет, и затем снова повышается в возрастных группах старше 40 лет до 85–95%. Важно, что именно на возраст 18-30 лет приходится максимум заболевших этой инфекцией, по результатам анализа заболеваемости корью жителей г. Москвы и Московской области за тот же временной период. При этом среди детей и подростков не было выявлено лиц, отвечающих на коревую инфекцию вторичным иммунным ответом. Это свидетельствует о том, что среди больных детей не было привитых. Среди взрослых больных четко различаются 2 подгруппы: отвечающие на инфекцию первичным иммунным ответом (80-90%) и реагирующие на корь вторичным иммунным ответом (10-20%).

3.2 Гуморальный иммунитет к антигенам вирусов кори и краснухи у здоровых людей в возрасте 18-30 лет.

В описанном в разделе 3.1 исследовании состояния коллективного противокорьевого иммунитета было показано, что в возрастной группе 18-30 лет выявляется минимальный уровень серопозитивных к вирусам кори. В связи с этим было предпринято более углубленное изучение гуморального противокорьевого иммунитета в этой возрастной подгруппе. Для этого дополнительно был оценен специфический гуморальный иммунитет к антигенам вирусов кори и краснухи у 100 здоровых людей в возрасте от 18 до 30 лет. В результате наших исследований серонегативными к антигенам вируса кори оказались 68%, а к вирусу краснухи только 5% лиц этой возрастной группы. Было установлено, что средний уровень антител к антигенам вирусов краснухи у данной группы обследованных составляет 175,5 (82,99 – 466,1) МЕ/мл (Me (LQ-UQ)), превышая уровень отсечки (25 МЕ/мл). Средний уровень противокоревых антител оказался ниже уровня отсечки (0,2 МЕ/мл) и составил 0,09 (0,02-0,26) МЕ/мл (Me (LQ-UQ)). Структура гуморального иммунитета, специфичного к вирусам кори и краснухи по

уровню специфических IgG-антител представлена на рисунке 3.5. По результатам данного исследования установлено, что из 100 здоровых человек большинство обследованных

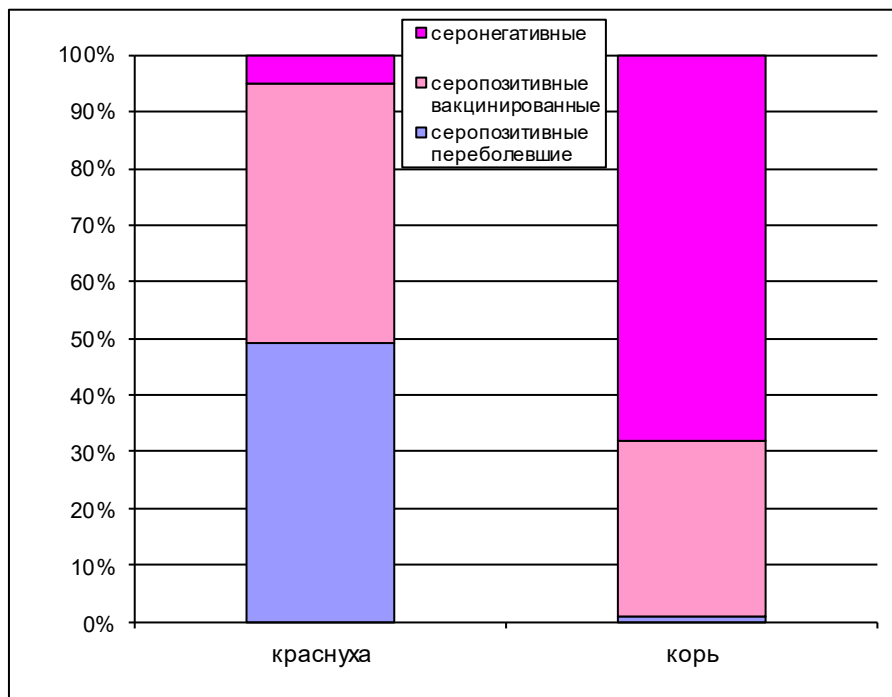


Рисунок 3.5 - Структура гуморального иммунитета (% лиц с антителами класса IgG) против вирусов кори и краснухи у здоровых людей 18-30 лет.

данной возрастной группы имеет уровни антител к антигенам вируса краснухи выше 25 МЕ/мл, полученные в результате перенесенного ранее заболевания у 49 из 100 (49%) либо вакцинации у 46 из 100 (46%). У 5 из 100 обследованных (5%) антитела к вирусу краснухи отсутствовали (<25МЕ/мл).

При исследовании антител против вируса кори установлено, что из 100 человек только один (1%) имел высокий уровень специфических IgG-антител, приобретенный в результате перенесенного заболевания, у 31 человека (31 %) IgG-антитела были сформированы в результате вакцинации. Серонегативными оказались 55 обследованных (55%) и еще 13 (13 %) имели специфические антитела в следовых количествах, ниже уровня отсечки (0,2 МЕ/мл). Таким

образом, 68 обследованных лиц (68%) оказались незащищенными от кори по уровню специфических IgG-антител.

На следующем этапе исследования у выявленных 68 незащищенных от кори индивидуумов был уточнен прививочный анамнез. Установлено, что 28 человек (41,18%) не имели сведений о прививках, у 40 обследованных (58,82%) такие сведения имелись. Четверо из них предоставили сведения только о первой прививке в возрасте 1 года и 3 – только сведения, о вакцинации по возрасту, без указания конкретной прививки против кори. Возможно, данные серонегативные лица были действительно вакцинированы против вируса кори, но утратили иммунную защиту в процессе жизни, или сведения о прививках не соответствовали действительности. В любом случае, эти люди составляют группу риска по заболеванию корью.

Исследования, описанные в разделе 3.1 выявили отсутствие специфического гуморального иммунитета к вирусу кори в возрастной группе 18-30 лет у 42,5% обследованных, тогда как в описываемом исследовании выявлено 68% серонегативных к кори. Данные различия могут объясняться тем, что в предыдущем исследовании в группу обследованных входили только жители Москвы. Известно, что в Москве каждый год регистрируются вспышки кори, поэтому в Москве у восприимчивых к вирусу кори людей есть больше вероятности встретить дикий штамм вируса кори и заболеть. Так, в исследуемой возрастной группе жителей Москвы 20% людей имели антитела против вирусов кори, приобретенные в результате перенесенной инфекции. В описываемом исследовании в группу здоровых людей в возрасте 18-30 лет были отнесены люди, проживающие на всей территории Российской Федерации. Вспышки кори отсутствуют на многих территориях России в течение ряда лет. Это приводит к тому, что восприимчивые к кори люди не встречаются с вирусом кори и могут не болеть. По-видимому, из-за этого, только 1% обследованных приобрел иммунитет в результате заболевания корью.

3.3 Формирование гуморального иммунитета на коревую вакцину у взрослых.

Все 68 выявленных серонегативных индивидуумов были привиты коревой вакциной, но только у 50 из 68 первоначально включенных в исследование человек был исследован поствакцинальный иммунитет. Через 6 недель после вакцинации эти 50 человек были обследованы методом ИФА на наличие противокоревых антител классов IgM, IgG, IgA и субклассов IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Все обследованные привитые выработали противокоревые антитела класса IgG. Средний уровень IgG-антител против антигенов вируса кори составил 1,33 (0,85-1,82) МЕ/мл (Me (LQ-UQ)). Кроме того, были обнаружены противокоревые IgA-антитела в количестве 0,655 (0,423-1,208) МЕ/мл (Me (LQ-UQ)). Через 6 недель после вакцинации не было обнаружено специфических IgM-антител.

Как известно, первичный и вторичный тип иммунного ответа различаются по спектру субклассов специфических IgG-антител. Для первичного типа иммунного ответа типично преобладание IgG3-субкласса, тогда как для вторичного – IgG1-субкласса [116, 118, 119]. Так серонегативные люди, которые были привиты против кори в детстве, но потеряли противокоревые антитела в процессе жизни, будут отвечать на вакцинацию вторичным типом иммунного ответа, тогда как те, кто не были реально вакцинированы в детстве, ответят на прививку первичным типом иммунного ответа. Всех привитых от кори разделили по спектру субклассов специфических IgG на подгруппу А, ответившую на вакцинацию первичным типом иммунного ответа, и подгруппу Б, ответившую на прививку вторичным иммунным ответом. Установлено, что первичный тип иммунного ответа на вакцинацию против кори продемонстрировали 24 из 50 (48%) обследованных человек, а вторичным типом иммунного ответа реагировали 26 (52%) человек (абсолютные значения представлены в таблице 3.4). По уровню противокоревых IgG-антител эти две подгруппы не различались, но они имели

Таблица 3.4 - Показатели специфического гуморального иммунного ответа через 6 недель после вакцинации против вируса кори. Me (LQ-HQ)

	IgG(МЕ/мл)	IgG1 (МЕ/мл)	IgG2 (МЕ/мл)	IgG3 (МЕ/мл)	IgG4 (МЕ/мл)	IgA (МЕ/мл)	Авидность (%)
Первичный иммунный ответ (подгруппа А) 24 человека	1,24 (0,69-1,95)	0,80 (0,56- 0,98)	0 (0-0)	0,96 (0,67- 1,02)	0 (0- 0,12)	0,73 (0,51- 1,29)	39,8 (34,2- 43,1)
Вторичный иммунный ответ (подгруппа Б) 26 человек	1,35 (0,87- 1,75)	1,18 (0,83- 1,57)	0 (0-0)	0,22 (0,17- 0,36)	0,12 (0- 0,15)	0,61 (0,40- 0,91)	82,8 (81,5- 84,5)

разный спектр специфических IgG1-и IgG3-субклассов и различались по авидности антител.

На рисунке 3.6 продемонстрированы различия в профилях субклассов специфических IgG-антител среди лиц, ответивших первичным (подгруппа А) и вторичным (подгруппа Б) типом иммунного ответа на прививку от кори. В подгруппе А авидность антител колебалась от 27,5 до 51,1% (медиана 39,8%), а в подгруппе Б – от 73,6 до 88,3% (медиана 82,8%). Параметры первичного и вторичного иммунного ответа различаются с высокой степенью значимости ($\chi^2 = 278,716$; $p \ll 0,0001$).

Сопоставив результаты определения авидности и спектра субклассов противокоревых IgG-антител через 6 недель после прививки и данные о прививках из медицинских карт, мы выяснили, что в подгруппе А, ответившей на вакцинацию первичным типом иммунного ответа 62,5% имели сведения о проведенных в детстве двукратных прививках от кори (рисунок 3.7). В тоже время, в подгруппе Б, ответившей на прививку вторичным типом иммунного ответа, только 57,7% людей имели сведения о прививках против кори.

Таким образом, все 50 изначально серонегативных людей после вакцинации против кори сформировали противокоревые IgG-антитела. Из 50 привитых 26 человек (52 %) ответили по вторичному типу. Эти люди были привиты от кори в детстве, но утратили в процессе жизни противокоревые антитела. Очевидно, у них сохранились В-клетки памяти. Эти клетки никак не

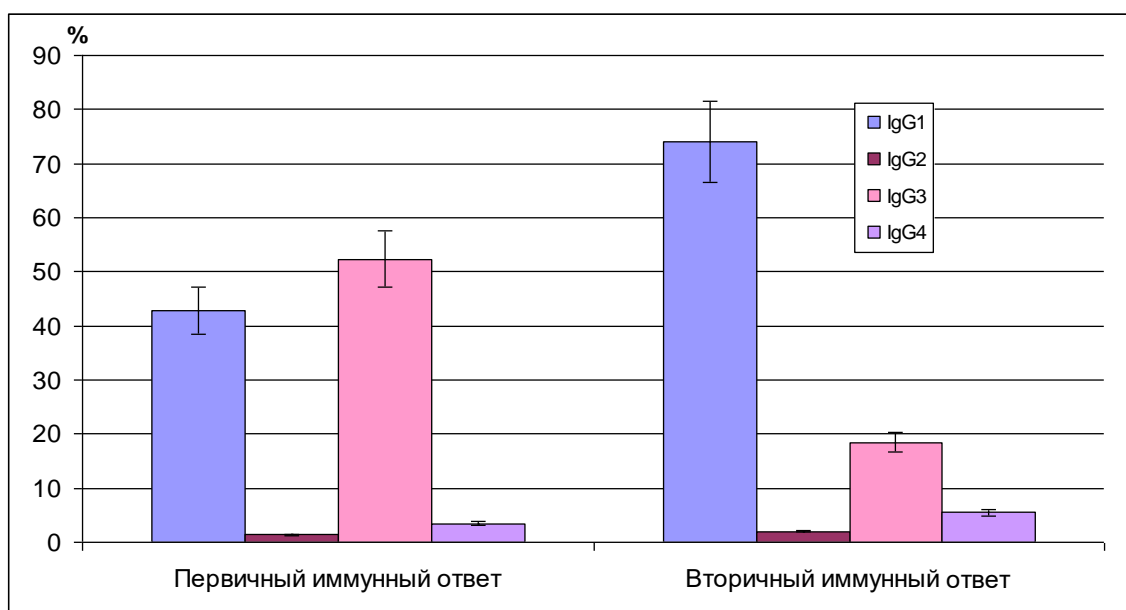


Рисунок 3.6 - Спектр субклассов противокоревых IgG-антител у первоначально серонегативных взрослых через 6 недель после прививки (в процентах от общего противокоревых IgG).

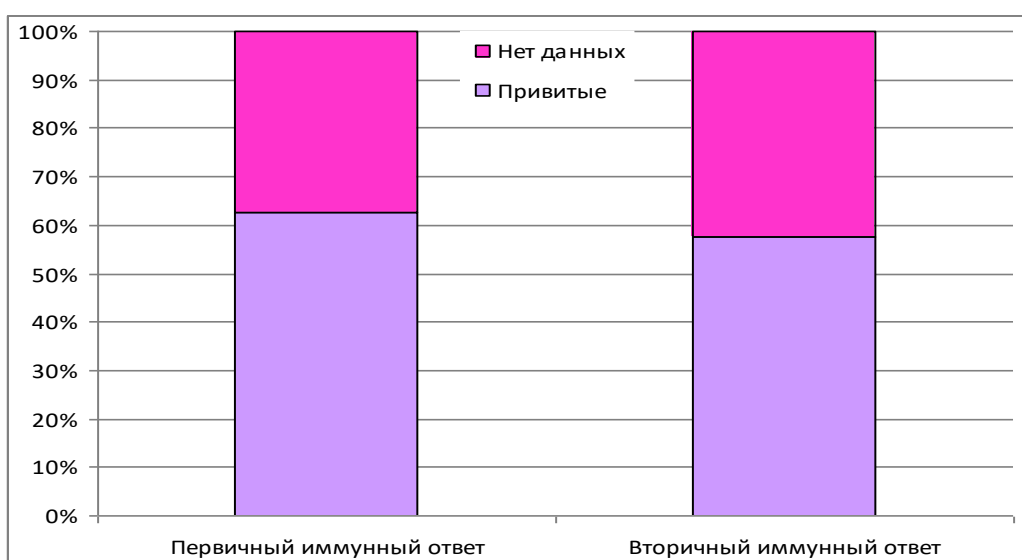


Рисунок 3.7 - Сопоставление данных прививочных карт и типов иммунного ответа у привитых взрослых.

проявляют себя, пока есть антитела и нет встречи с вирусом. Но со времени вакцинации в детстве они несут перестроенные рецепторы, преимущественно IgG1-субкласса. Поэтому, при проведенной нами вакцинации (а для этой когорты – ревакцинации), В-клетки памяти быстро активировались, воссоздали популяцию плазматических клеток с уже перестроенным рецептором, которые быстро начали синтезировать специфические антитела

преимущественно IgG1-субкласса. Практически половина привитых (48%) ответили на вакцинацию первичным типом иммунного ответа, что свидетельствует об отсутствии у них как специфических плазматических клеток, так и В-клеток памяти. Эти люди, по-видимому, либо вовсе не были привиты, либо были привиты некачественной вакциной. Подобный контингент наиболее подвержен заболеванию корью.

3.4 Сопоставление гуморального иммунного ответа у взрослых больных корью и привитых от этой инфекции

Для сопоставления постинфекционного и поствакцинального гуморального иммунитета на антигены вируса кори дополнительно было обследовано 100 человек: пациенты, заболевшие корью (50 человек, 6-й день после появления сыпи) и группа серонегативных здоровых взрослых, имевших сведения о прививке в детстве против кори - 50 человек. Возрастной состав групп был следующим: молодые люди 20-35 лет среди больных – 27 из 50 человек (54,0 %) среди привитых – 37 из 50 (74,0%), люди среднего возраста 36-45 лет среди больных – 17 из 50 (34,0 %), и среди привитых – 10 из 50 (20,0 %), и люди старше 46 лет среди больных – 6 из 50 (12,0 %) и среди привитых – 4 из 50 (8,0%) (Рисунок 3.8). Исследование образцов сывороток крови методом ИФА показало, что у всех 50 больных корью присутствовали антитела класса IgM и IgG. В сыворотках крови группы серонегативных до вакцинации антитела классов IgM и IgG отсутствовали. Группа серонегативных была вакцинирована от кори и через 6 недель после этого вновь обследована на наличие противокоревых антител.

Для определения типа иммунного ответа (первичный или вторичный) на контакт с антигенами вируса кори, у обследуемых обеих групп был изучен спектр субклассов (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) специфических противокоревых IgG-антител. Как описано ранее [116, 118,119, 145], при первичном типе иммунного ответа, как у больных, так и у привитых, среди специфических антител преобладают IgG3-антитела, а при вторичном типе – IgG1-антитела.

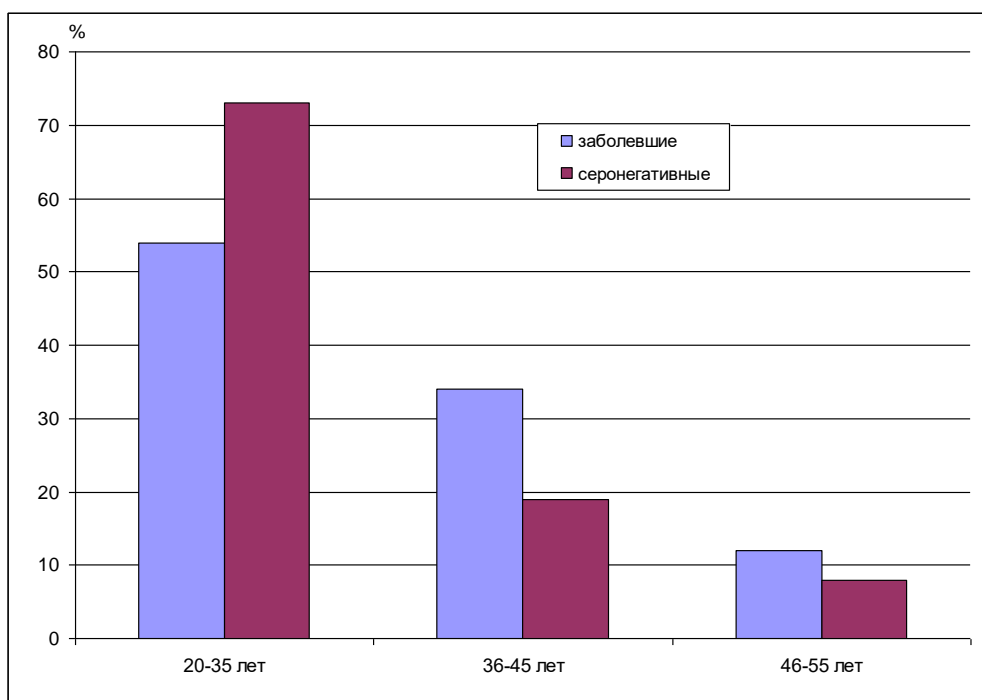


Рисунок 3.8 - Распределение обследованных лиц по возрасту.

Результаты исследования по распределению субклассов специфических противокоревых антител представлены на рисунке 3.9, у привитых (а) и больных корью (б). Выявлено, что в группе привитых 22 человека (44%) ответили на вакцинацию первичным типом иммунного ответа, а 28 человек (56%) - вторичным типом. В группе больных корью 17 пациентов (34%) ответили первичным типом, а 33 человека (66%) - вторичным. Наличие вторичного типа иммунного ответа как у привитых, так и у больных, вероятно, говорит о том, что ранее эти люди были вакцинированы от кори, но в процессе жизни противокоревые антитела были утрачены.

Данные по определению уровней специфических антител классов IgG и IgA и исследованию индекса avidности антител представлены в таблице 3.5. Из представленных данных видно, что в группе заболевших корью уровень IgA антител на 6-ой день после появления сыпи в несколько десятков раз выше, чем у вакцинированных через 6 недель после прививки. При этом концентрация IgG антител у больных, ответивших вторичным типом иммунного ответа, в 10 раз выше, чем у соответствующей группы привитых

($p < 0,01$), и в 50 раз выше, чем у больных, ответивших первичным типом иммунного ответа ($p < 0,001$).

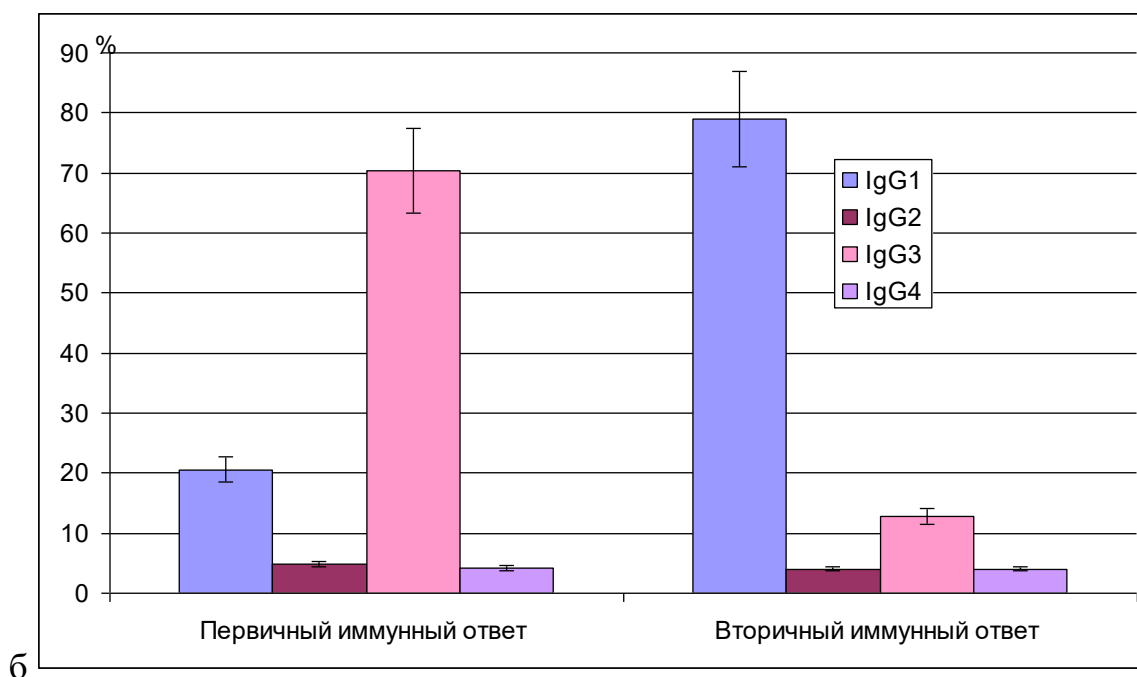
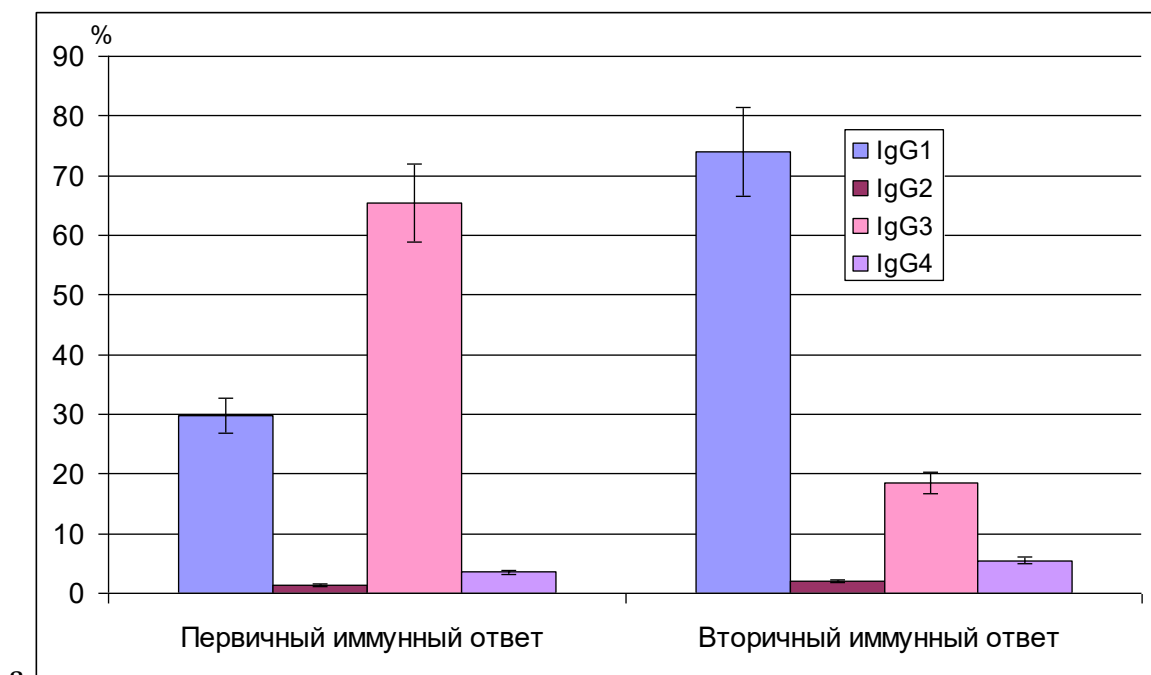


Рисунок 3.9 - Распределение противокоревых IgG-антител по субклассам (а)привитые, (б)больные.

В целом в группе заболевших и группе привитых концентрация противокоревых IgG-антител значительно выше у тех, у кого иммунный ответ развился по вторичному типу ($p < 0,05$), что является вполне ожидаемым (так

как некоторое количество клеток памяти у них явно осталось). Четко видно, что у обследованных с первичным типом ответа

Таблица 3.5 - Гуморальный иммунный ответ на вирусы кори Me(LQ-HQ).

		IgA(МЕ/мл)	IgG (МЕ/мл)	Авидность (%)
Привитые n=50	Первичный ответ n=22	0,78 (0,55-1,33)	1,17 (0,63-1,75)	33,6 (29,2-39,5)
	Вторичный ответ n=28	0,67 (0,49-0,94)	1,48 (0,89-1,87)	79,8 (75,4-83,9)
Больные n=50	Первичный ответ n=17	44,2 (39,2-58,2)	0,71 (0,44-1,2)	28,5 (22,65-38,35)
	Вторичный ответ n=33	47,5 (37,9-59,6)	14,43 (5,47-29,71)	77,8 (60,7-96,2)

индекс авидности антител значительно ниже, чем у обследованных, ответивших развитием иммунного ответа по вторичному типу. При первичном ответе средний индекс авидности равен 33,6% у привитых и 28,5% у больных. При вторичном иммунном ответе в обеих группах были выявлены высокоавидные антитела, что подтверждает правомерность деления пациентов на группы с первичным и вторичным иммунным ответом, как это было сделано по спектру субклассов IgG.

Кроме того, у пяти пациентов, ответивших на инфекцию первичным типом иммунного ответа через 6 дней от момента высыпаний, провели также определение показателей гуморального иммунитета против кори через 3 недели после высыпаний (см. рисунок 3.10). У указанных пациентов производили забор крови через 3 недели после появления сыпи по медицинским показаниям. Из рисунка 3.10 видно, что у одних и тех же пациентов на стадии ранней реконвалесценции количество специфических IgG возросло в три раза ($p < 0,01$) по сравнению с показателями при острой инфекции. Напротив, уровень противокоревых IgA, понизился с 73,44 (69-75,3) МЕ/мл до 48,64 (45-56,4) МЕ/мл, оставаясь, тем не менее, очень высоким (на рисунке не показано). Заметно, что за это время изменился и спектр субклассов противокоревых IgG. Если на стадии острой инфекции профиль

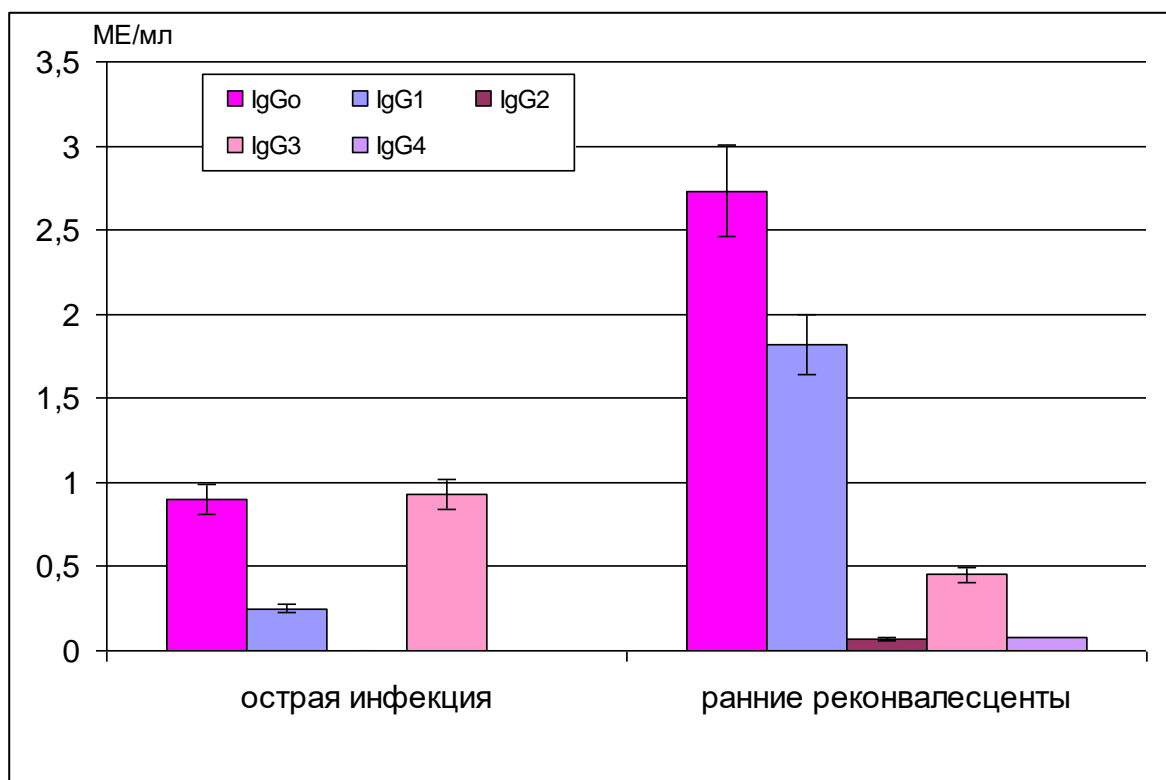


Рисунок 3.10 - Сопоставление показателей гуморального иммунитета при острой коревой инфекции и у ранних реконвалесцентов.

субклассов соответствовал первичному иммунному ответу (высокие IgG3 и низкие IgG1), то на стадии ранней реконвалесценции спектр субклассов IgG изменился на вторичный тип (низкие IgG3 и высокие IgG1), что типично для ответа клеток памяти.

Таким образом, при исследовании уровня гуморального иммунитета, специфичного к антигенам вирусов кори и краснухи у условно здоровых жителей г. Москвы и Московской области было выявлено, что к возрасту 14 лет антитела к вирусу кори имеют 81,3% обследованных, а к вирусу краснухи 92% обследованных. При этом уровень выше 90% серопозитивных к вирусу краснухи выявляется в группах 15-60 лет. однако в возрастной группе 18–30 лет обнаружено наиболее выраженное увеличение уровня серонегативных к вирусу кори (40% и более), тогда как в группах старше 40 лет уровень серопозитивности достигал уровня 85–95%. И именно на возраст 18-30 лет приходится 28,0% заболевших этой инфекцией, на возраст 31-40 лет - 24,1%, а

на возраст 51-60 лет - всего 2,63%. Результаты анализа заболеваемости корью в разных возрастных группах показали, что среди взрослых больных (18–40 лет) ответили на инфекцию вторичным типом иммунного ответа 18,1%, тогда как среди детей и подростков таких больных выявлено не было, что свидетельствует о том, что среди детей болели только непривитые, а среди взрослых были как непривитые, так и вакцинированные в детстве, но утратившие антитела.

При исследовании формирования гуморального иммунитета на коревую вакцину у 50 серонегативных взрослых (18-30 лет), было выявлено, что 48% ответили первичным типом иммунного ответа, т.е. ранее эти пациенты не встречались с вирусом кори, тогда как 52% продемонстрировали вторичный тип иммунного ответа на вакцинацию, то есть они были привиты в детстве от этой инфекции, но утратили противокоревые антитела.

Сопоставление гуморального иммунного ответа у больных корью и вакцинированных от кори выявили, что среди привитых ответили первичным типом иммунного ответа на контакт с вирусом 44 %, а среди больных корью – 34 %. При этом 66% больных и 56% изначально серонегативных привитых были ранее вакцинированы против вируса кори, что подтверждается иммунным ответом, который развивается по вторичному типу. Показано, что концентрация IgA к вирусу кори у больных существенно выше, чем у вакцинированных независимо от типа иммунного ответа.

По мере созревания иммунного ответа у больных корью, отвечающих первичным типом ответа, происходит снижение специфических IgA, повышение специфических IgG и переключение спектра субклассов специфических IgG с преобладания IgG3-антител на преимущественно IgG1-ответ, что характерно для ответа формирующихся клеток памяти.

Полученные данные свидетельствует о том, что привитые в детстве взрослые могут заболеть корью в случае утраты противокоревых антител в процессе жизни.

ГЛАВА 4.

ПРОВЕДЕНИЕ ВНУТРИЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ АНТИТЕЛ КЛАССА G К ВИРУСАМ КОРИ И КРАСНУХИ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ПОМОЩЬЮ КОНТРОЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

4.1. Проведение внутрилабораторного контроля качества при определении IgG-антител к вирусам кори методом иммуноферментного анализа.

Для стандартизации процедур качественного и количественного определения антител класса IgG к вирусу кори была проведена работа по отработке методики проведения внутрилабораторного контроля качества (ВКК) этих исследований. Эту работу проводили одновременно с сероэпидемиологическим обследованием 654 условно здоровых жителей г. Москвы и Московской области с неизвестным прививочным анамнезом в возрасте от 0 до 60 лет на наборах «Векто-Корь IgG» производства компании «Вектор-Бест». В инструкции к набору указано, что результаты можно оценивать как количественным, так и качественным способом, поэтому при дальнейшей работе с препаратом для внутрилабораторного контроля качества использовали оба способа учета – качественный (ОП, о.е.) и количественный (МЕ/мл). В связи с тем, что подходы к проведению работы с препаратом для внутрилабораторного контроля качества совпадают как для качественного, так и для количественного анализа, в дальнейшем оба варианта рассматривались параллельно. В качестве контрольного образца для отработки процедуры контроля качества для оценки внутри- и межсерийной сходимости (далее сходимость и воспроизводимость) анализа использовали препарат «ВЛК Корь-IgG» (лиофильно высушенный препарат, содержащий IgG к вирусу кори) (далее по тексту ВЛК). Аттестацию ВЛК проводили совместно с сотрудниками референс-лаборатории ЕРБ ВОЗ, ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского».

4.1.1 Подбор и определение рабочей концентрации «ВЛК Корь-IgG»

Существует рекомендация ВОЗ для неколичественных методов определения IgM к вирусам кори использовать разведение контрольного материала со значениями ОП в пределах 2-3 cut-off [300]. Рекомендаций ВОЗ для контрольных материалов при определении противокоревых IgG нет. В то же время, в России есть рекомендации для контрольных материалов при определении IgG, но другой специфичности. Рекомендуют использовать разведение со значениями ОП 0,5-1,5 о.е. [48]. Нами были исследованы оба варианта подбора разведения для контрольных материалов при тестировании IgG к кори.

На первом этапе была проведена предварительная серия экспериментов для подбора рабочей концентрации (разведения) препарата «ВЛК Корь-IgG» с целью использования указанного ВЛК при одновременном исследовании образцов сывороток крови, как для количественного, так и для качественного учета результатов ИФА. Для этого была приготовлена серия двукратного разведения препарата ВЛК (от цельного до разведения 1:8). Разведение ВЛК производили с помощью донорской сыворотки крови, которая не содержала антитела класса IgG к вирусу кори. Каждое разведение было протестировано в трех повторях на двух разных сериях набора «ВектоКорь-IgG» (таблица 4.1).

Таблица 4.1 - Результаты сравнения оптической плотности и концентрации ВЛК в двух сериях

Показатели	Серия № 88		Серия № 103	
	ОП, о.е.	МЕ/мл	ОП, о.е.	МЕ/мл
ВЛК цельный	1,217	0,81	0,896	0,80
ВЛК 1/2	0,534	0,44	0,312	0,40
ВЛК 1/4	0,177	0,22	0,284	0,38
ВЛК 1/8	0,096	0,14	0,103	0,20
КО*	2,227	1,56 (1,22-2,0)*	1,720	1,32 (1,05-1,71)*

Примечание: КО* - контрольный образец, входящий в состав набора, в скобках указаны пределы концентрации для контрольного образца (паспортные данные).

Следует отметить, что несмотря на наблюдаемые различия в величинах ОП (о.е.) для калибраторов и образцов ВЛК: цельного (ВЛК₁) и разведенного 1:2 (ВЛК₂) отличались, полученная концентрация (МЕ/мл) ВЛК₁ и ВЛК₂ была

одинаковой, даже при использовании двух различных серий наборов. Для разведений ВЛК 1:4 и 1:8 рассчитанные по калибровочному графику концентрации достоверно ($p < 0,05$) отличались от, вероятно, связано, во-первых, с погрешностями при приготовлении серийных разведений, и, во-вторых, с измерением слишком низких значений ОП, которые оказались меньше 0,2 о.е., поэтому было решено, что использование разведения ВЛК 1:4 и 1:8 в дальнейшей работе нецелесообразно. Используя полученные результаты, были построены калибровочные кривые. В соответствии с инструкцией к набору реагентов, использован метод построения «от точки к точке» (рисунок 4.1). Именно по этим калибровочным графикам и были рассчитаны концентрации ВЛК₁ и ВЛК₂ в разведениях от цельного до 1:8.

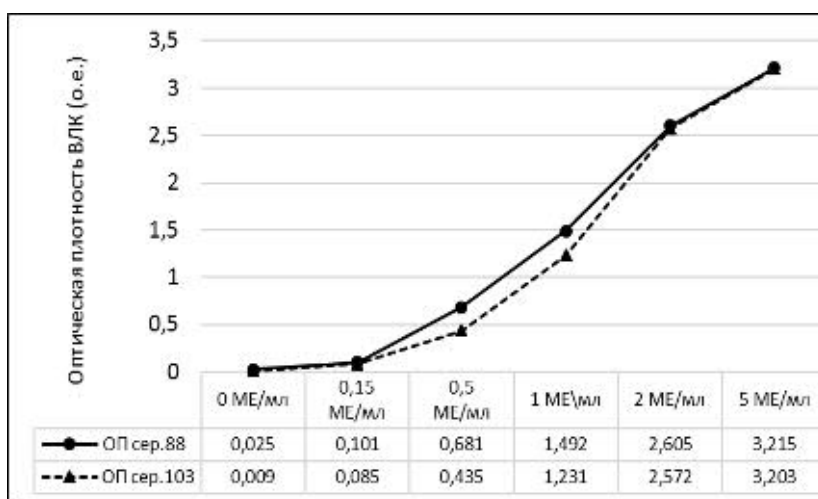


Рисунок 4.1 - Калибровочные графики ВЛК для определения концентрации содержания IgG к вирусу кори для двух серий

На рисунке представлены два калибровочных графика для двух серий набора. Из рисунка видно, что калибровочные графики практически совпадают (имеют сходный вид). Это подтверждает рассчитанный коэффициент корреляции (R^2), который был равен 0,669, что свидетельствует о положительной корреляции средней силы (рисунок 4.2). Приведенные выше данные позволяют сделать заключение о возможности использования ВЛК₁ и ВЛК₂ для качественного (ОП о.е.) и количественного (МЕ/мл) способа учета результатов.

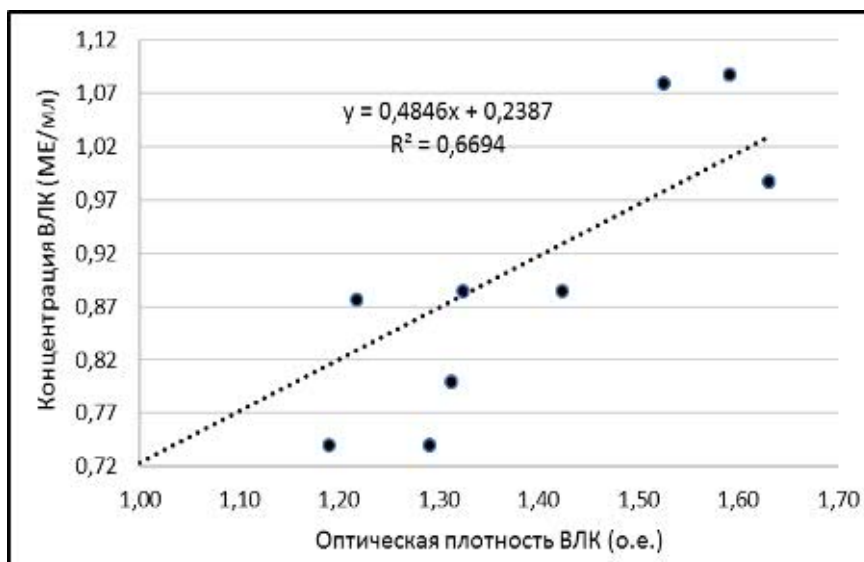


Рисунок 4.2 - Корреляция между оптической плотностью и концентрацией при измерении ВЛК₁.

4.1.2 Определение некоторых параметров вариационной статистики при исследовании препаратов ВЛК₁ и ВЛК₂

Поскольку набор реагентов для определения IgG к вирусу кори «ВектоКорь-IgG» устроен таким образом, что калибраторы и контрольный образец не проходят стадию разведения при постановке ИФА, а исследуемые образцы разводятся в 100 раз, и это разведение проводят в 2 стадии. Сначала делают предварительное разведение 1:10 на вспомогательном планшете, а затем второе разведение 1:10 на рабочем планшете. Такая же схема проведения анализа характерна и для многих других наборов для определения антител к инфекционным агентам. При этом контрольные материалы, согласно приказу 45 [81] должны проходить все те же стадии разведения, как и сыворотки. Поэтому препарат ВЛК разводили в 100 раз, как и сыворотки, в 2 стадии - сначала 1:10 на вспомогательном планшете и последующее разведение 1:10 на рабочем планшете. На втором этапе исследований проводили определение CV как для калибраторов и КО, так и для образцов ВЛК₁ и ВЛК₂ и сопоставляли их между собой (калибраторы и КО готовы к применению, а образцы и ВЛК разводятся в 100 раз). Для этого были проанализированы данные 20 аналитических серий каждого исследуемого

материала и рассчитаны их средние значения ОП (о.е.) и CV (таблица 4.2). Из таблицы следует, что CV для различных калибраторов достоверно

Таблица 4.2 - Средние значения и коэффициент вариации оптической плотности калибровочных образцов и контрольного образца, входящего в состав набора и ВЛК

	Концентрация МЕ/мл (калибровочные образцы)						КО	ВЛК ОП/(МЕ/мл)		
	0	0,15	0,5	1	2	5		ВЛК ₁	ВЛК ₂	ВЛК ₂ *
ОП _{сред.}	0,022	0,108	0,681	1,493	2,601	3,211	2,12	1,29/0,86	0,534/0,57	0,298/0,42
CV _{оп, %}	30	17	15,4	11,3	5	1,9	12,5	19,0/16,8	23,5/26,7	17,7/10,6

Примечание: ВЛК₁ – цельный, ВЛК₂ - разведенный 1:2, ВЛК₂* - другая серия разведений 1:2.

отличаются, ($p < 0,05$), и чем меньше ОП, а значит - и концентрация образца, тем больше коэффициент вариации. В инструкции по применению указан диапазон серой зоны от 12 до 18 МЕ/мл, что соответствует $\pm 20\%$. Оказалось, что для калибратора, выполняющего роль порогового образца (cut-off - 0,15 МЕ/мл), CV равен 17%, что практически совпало с указанным производителем значением ($\pm 20\%$). Такой коэффициент вариации в области порогового значения, вероятно, является одной из причин феномена «мигания образцов», когда для образцов с низкой концентрацией аналита при повторных исследованиях могут получать противоречивые результаты: положительные, сомнительные, или отрицательные. В таких случаях, согласно инструкции производителя, следует провести повторное исследование сыворотки крови пациента через 10-15 дней. Более того, на примере ВЛК₁ и ВЛК₂ видно, что наличие стадии разведения увеличивает погрешность измерения концентрации (МЕ/мл) – для ВЛК₁ погрешность ОП (о.е.) составила 19,0%, в МЕ/мл-16,8%, тогда как для ВЛК₂ эти показатели составили 23,5% и 26,7% соответственно. Важно, что для ВЛК₁ мы получили более низкий CV для концентрации, а для ВЛК₂, наоборот, CV оказался ниже для ОП (о.е.). Мы предполагаем, что это можно объяснить, как появлением дополнительной

стадии разведения в 2 раза для образца ВЛК₂, так и смещением его ОП (о.е.) в область более низких значений.

При более тщательном изучении полученных результатов количественного учета значений ВЛК выяснилось, что полученная концентрация для ВЛК₂, практически совпала с концентрацией (МЕ/мл) тестового калибратора 0,5 МЕ/мл, и именно для концентрации ВЛК₂ был получен самый высокий CV. Согласно инструкции производителя, калибровочная кривая строится «от точки к точке», и имеет нелинейный характер, а это значит, при построении калибровочного графика для расчета концентрации по калибровочным образцам 0, 0,15, 0,5, 1, 2, 5 МЕ/мл на каждом участке кривой будет использовано свое уравнение, по которому в автоматическом режиме рассчитывается концентрация (МЕ/мл) антител в образцах крови пациентов и ВЛК. В нашем эксперименте полученные значения образца ВЛК₂ получились в диапазоне 0,418 - 0,722 МЕ/мл (ср.зн. 0,57 МЕ/мл), видно что эти значения оказались по обе стороны от калибровочного образца с концентрацией 0,5 МЕ/мл, т.е. попали в зону «точки калибратора». Следовательно, расчет концентрации для значений ОП ВЛК₂, расположенным справа и слева от «точки калибратора» производился по разным уравнениям, что и дало более высокий CV (26,7 %) по сравнению с ВЛК₁, который не попал в зону «точки калибратора», CV которого составил 16,8%. Справедливость заключений о зависимости CV от попадания значений ВЛК₂ в зону «точки калибратора» была подтверждена результатами исследования повторно приготовленного разведенного контроля - ВЛК₂*, интервал значений ОП которого составил 0,375-0,465 МЕ/мл и был вне зоны «точки калибратора». При этом были показаны лучшие значения CV (10,6 %) по МЕ/мл и по ОП CV 17,7 % (см. таблицу 4.2). Об этом же свидетельствуют результаты расчетов ВЛК₁+2S, что составило 1,152 МЕ/мл, которые попали в зону «точки калибратора» 1,0 МЕ/мл (таблица 4.3). Однако, согласно нормальному распределению, 68,2 % значений попадают в интервал $\pm 1S$, а это

объясняет полученные CV для концентрации для ВЛК₁, которые больше чем для ВЛК_{2*} и меньше, чем для ВЛК₂.

Полученные результаты доказали, что при создании или выборе препарата ВЛК для работы, необходимо учитывать возможность попадания измеряемых значений ОП ВЛК в зону «точки калибратора». При этом расчет концентрации (МЕ/мл) будет происходить по двум разным уравнениям в зависимости от того, с какой стороны от точки калибратора окажется измеренное значение ОП(о.е.) ВЛК и, следовательно, разброс значений при расчете концентрации (МЕ/мл) будет больше. В связи с этим мы считаем, что одним из важнейших критериев выбора образца ВЛК для работы должно быть несовпадение концентрации образца ВЛК с любым из калибраторов, входящих в состав используемого набора реагентов. Более того, для определения реальных погрешностей при определении содержания антител к вирусу кори (как, собственно, и других аналитов, когда используется стадия предварительного разведения) и проведения оперативного контроля качества образец ВЛК должен проходить те же стадии разведения, что и исследуемые образцы пациентов. Такой подход позволит контролировать правильность стадии предварительного разведения исследуемых образцов, а, следовательно, и достоверность получаемых результатов. Учитывая полученные результаты, в дальнейшей работе были использованы ВЛК₁ (цельный) и ВЛК_{2*} (разведенный 1:2), значения которого не совпадали с «точками калибраторов».

4.1.3 Проведение внутрилабораторного контроля качества

Проведение ВКК осуществляли в три стадии:

Стадия 1 – оценка сходимости результатов измерений ВЛК;

Стадия 2 -оценка воспроизводимости результатов измерений ВЛК и построение контрольных карт;

Стадия 3 – проведение оперативного внутрилабораторного контроля качества.

Стадия 1. Оценка сходимости результатов измерений препарата для внутрилабораторного контроля качества.

Для оценки сходимости были проведены 10 измерений двух вариантов ВЛК₁ и ВЛК_{2*} в одной аналитической серии на одной планшете [20,81, 86]. Результаты учитывали двумя способами: качественным в ОП (о.е.) и количественным (МЕ/мл). На основе полученных 10 значений был рассчитан CV₁₀ для ВЛК₁, который оказался равным 8,0 % для качественного учета ОП (о.е.) и 7,1% для количественного (МЕ/мл); для ВЛК_{2*} эти показатели составили 7,7% и 6,4% соответственно.

Стадия 2. Оценка воспроизводимости результатов измерений препарата для внутрилабораторного контроля качества и построение контрольных карт.

Для оценки воспроизводимости результатов были проведены по 20 измерений для препаратов ВЛК₁ и ВЛК_{2*}. С целью сокращения времени, для построения контрольной карты проводили измерение два раза в день в течение 10 дней. Детектировали ОП (о.е.) для ВЛК₁ и ВЛК_{2*} и рассчитывали концентрацию (МЕ/мл). По полученным результатам рассчитывали средние показатели ОП (о.е.) и МЕ/мл, S и его контрольные пределы $\pm 1S$, $\pm 2S$, $\pm 3S$ и CV₂₀ [81, 86] (таблица 4.3).

Таблица 4.3 - Параметры для построения контрольной карты.

Показатель	ВЛК ₁		ВЛК _{2*}	
	МЕ/мл.	ОП.	МЕ/мл.	ОП.
X ср ВЛК	0,862	1,287	0,398	0,298
Ст. откл(S)	0,145	0,244	0,042	0,053
CV, %	16,78	18,98	10,55	17,68
X+1S	1,007	1,531	0,440	0,351
X-1S	0,718	1,043	0,356	0,245
X+2S	1,152	1,775	0,482	0,403
X-2S	0,573	0,798	0,314	0,193
X+3S	1,296	2,020	0,524	0,456
X-3S	0,428	0,554	0,272	0,140

По рассчитанным результатам были построены контрольные карты, выраженные в ОП (о.е.) и концентрации (МЕ/мл) для ВЛК₁ и ВЛК_{2*}.

Стадия 3. Проведение оперативного внутрилабораторного контроля качества.

Постановку серологического исследования 654 сывороток крови условно здоровых доноров методом ИФА проводили с использованием охарактеризованных выше ВЛК₁ и ВЛК_{2*}. Все значения ВЛК₁ и ВЛК_{2*} для качественного (ОП о.е.) и количественного (МЕ/мл) методов определения наносили на построенные контрольные карты (рисунки 4.3 а,б и 4.4 а,б) и

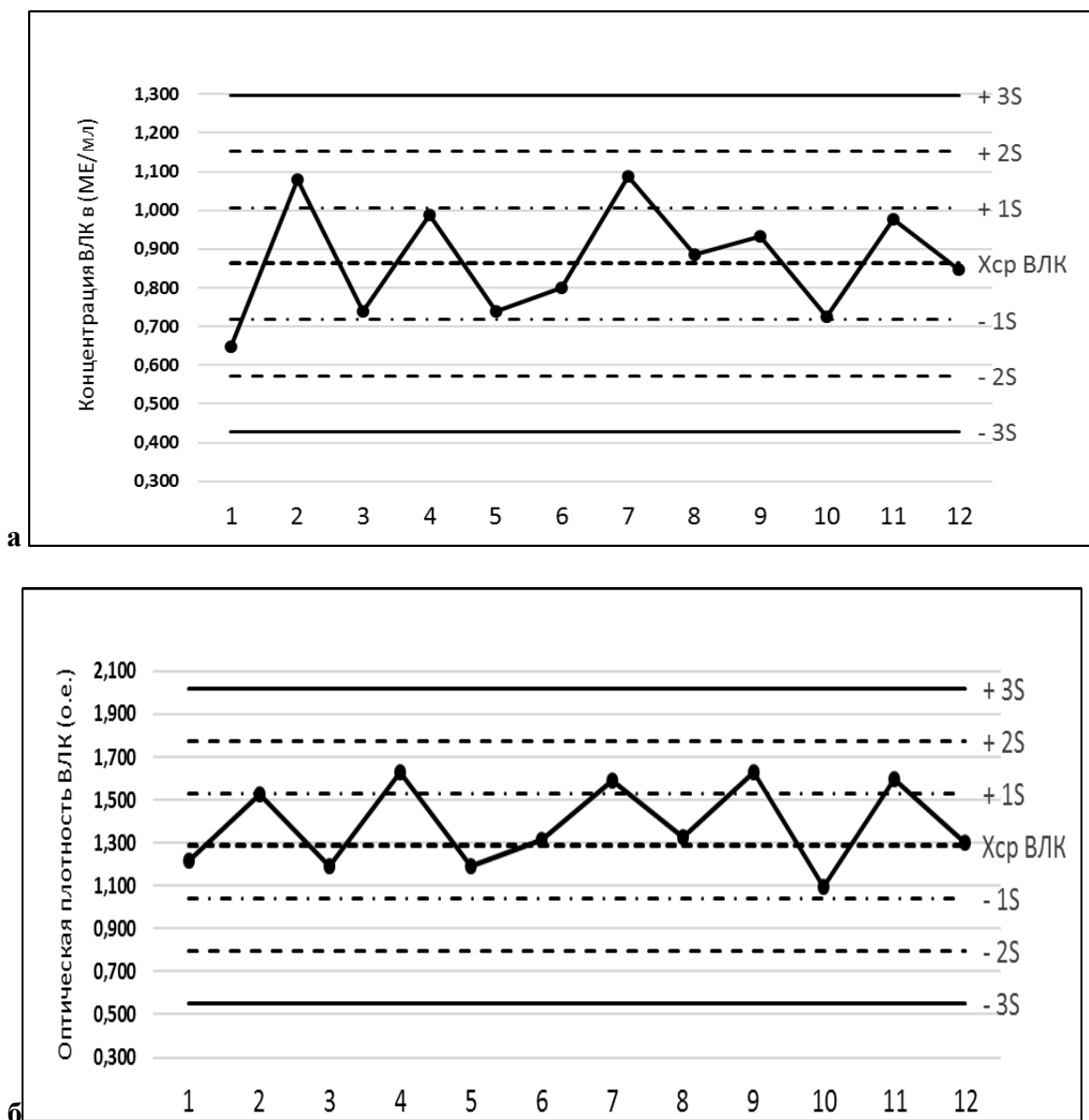


Рисунок 4.3 - Оперативный контроль качества для определения концентрации антител класса IgG к вирусу кори для цельного ВЛК.

а- По оси ординат отложена концентрация в МЕ/мл ВЛК₁,

б- По оси ординат отложена ОП ВЛК₁. По оси абсцисс- номер обследования

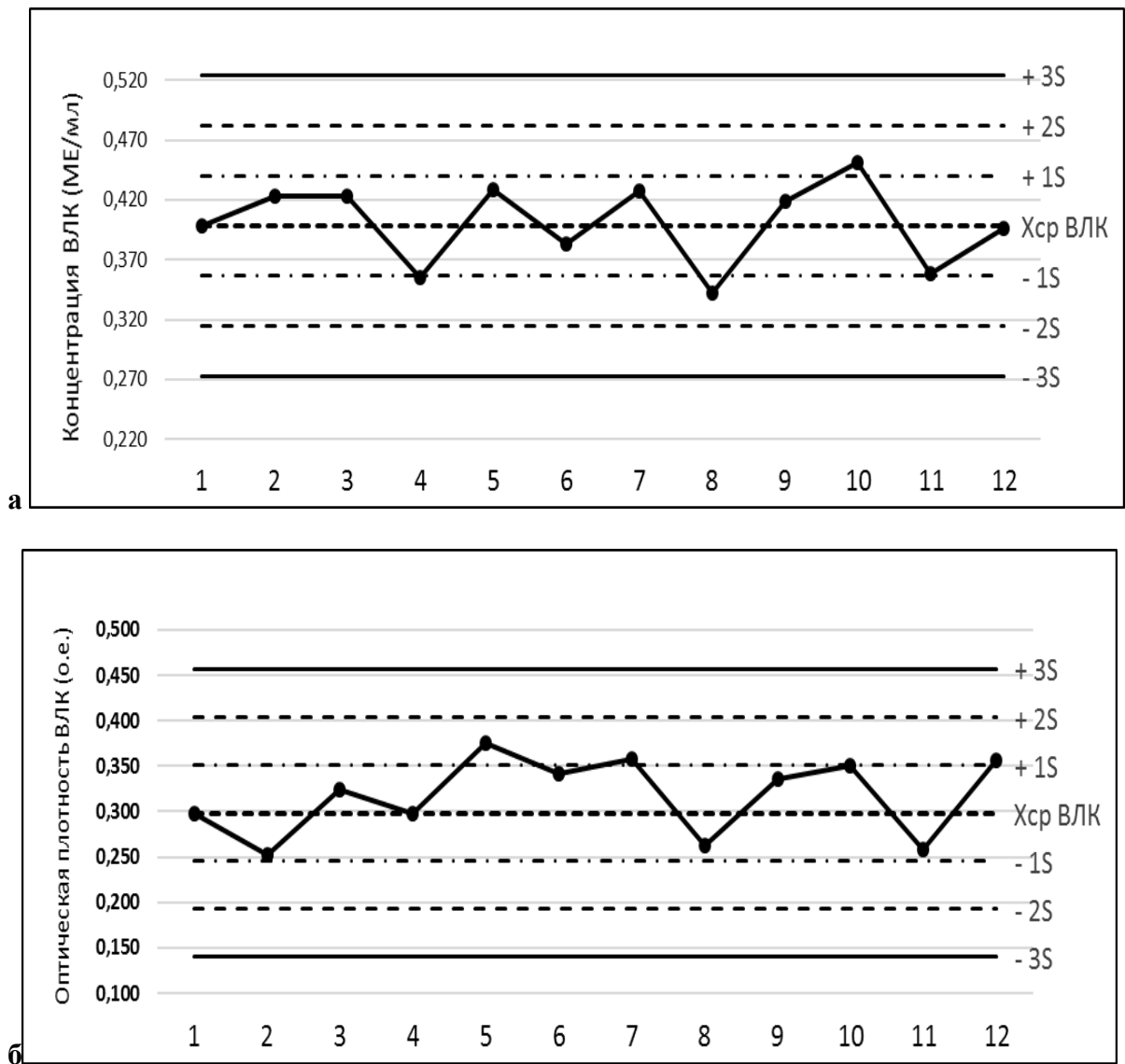


Рисунок 4.4 - Оперативный контроль качества для определения концентрации антител класса IgG к вирусу кори для ВЛК, разведенного 1:2.

а- По оси ординат отложена концентрация в МЕ/мл ВЛК_{2*},

б- По оси ординат отложена ОП ВЛК_{2*}. По оси абсцисс- номер обследования

оценивали приемлемость полученных результатов согласно с контрольными правилами Вестгарда. Полученные результаты находились в соответствии с контрольными правилами, что свидетельствует о практической пригодности контрольного материала «ВЛК Корь-IgG» и правильности работы всей аналитической серии в целом как при использовании его в виде цельного препарата (ВЛК₁), так и разведенного 1:2 (ВЛК_{2*})

4.2. Проведение внутрилабораторного контроля качества при определении IgG-антител к вирусам краснухи методом иммуноферментного анализа.

Одновременно с проведением сероэпидемиологического обследования условно здоровых жителей г. Москвы и Московской области с неизвестным прививочным анамнезом в возрасте от 0 до 60 лет (всего исследовано 654 сывороток крови) с использованием наборов «Векто-РубеллаIgG» производства компании «Вектор-Бест», была отработана методика проведения ВКК для качественного и количественного определения антител класса IgG к вирусу краснухи. Согласно инструкции к набору, результаты можно оценивать как количественным, так и качественным способом, и подходы к проведению работы с ВЛК совпадают как для качественного, так и для количественного анализа. Поэтому в дальнейшей работе с ВЛК оба варианта рассматривались параллельно. Препарат «ВЛК Рубелла-IgG» (лиофильно высушенный препарат, содержащий IgG к вирусу краснухи), использовали в качестве контрольного образца при отработке процедуры контроля качества для оценки внутри- и межсерийной сходимости анализа. Аттестация препарата была проведена совместно с сотрудниками референс-лаборатории ЕРБ ВОЗ, ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского».

4.2.1 Подбор и определение концентрации препарата «ВЛК Рубелла-IgG».

Ранее, на примере работы с препаратом «ВЛК Корь-IgG», нами было показано, что для построения контрольных карт показатели ОП (о.е.) и МЕ/мл образца ВЛК не должны находиться в зоне значений (точек) калибровочных образцов, входящих в состав набора реагентов. Кроме того, существуют рекомендации ВОЗ [300] (для неколичественных методов определения IgM), использовать контрольный материал со значениями ОП в пределах 2-3 cut-off. В то же время, в работе И.Г.Нетесовой с соавт., при определении HBsAg и антител к гепатиту С, ВИЧ и сифилису предложено использовать образец

ВЛК, в пределах значения ОП (о.е.) 0,5-1,5 о.е, а CV сходимости от 11 до 15 % [51].

Учитывая вышеизложенное, на первом этапе проведения ВКК был проведен подбор нужного разведения препарата «ВЛК Рубелла-IgG», для чего приготовили двукратные разведения ВЛК (от цельного до 1:8) с использованием сыворотки, не содержащей антитела класса IgG к вирусу краснухи. Каждое разведение было протестировано в триплетах с помощью набора «ВектоРубелла-IgG» серии 283 (таблица 4.4 и рисунок 4.5).

Таблица 4.4 - Результаты тестирования разведений «ВЛК Рубелла-IgG», выраженные в оптической плотности (о.е.) и концентрации (МЕ/мл).

Показатели	Серия № 283	
	ОП, о.е.	МЕ/мл
ВЛК цельный	1,702	94,4
ВЛК 1/2	1,062	40,6
ВЛК 1/4	0,626	23,5
ВЛК 1/8	0,466	17,3
КО*	1,144	43,8(32-51)*

Примечание: КО* - контрольный образец, входящий в состав набора, в скобках указаны пределы концентрации для контрольного образца (паспортные данные).

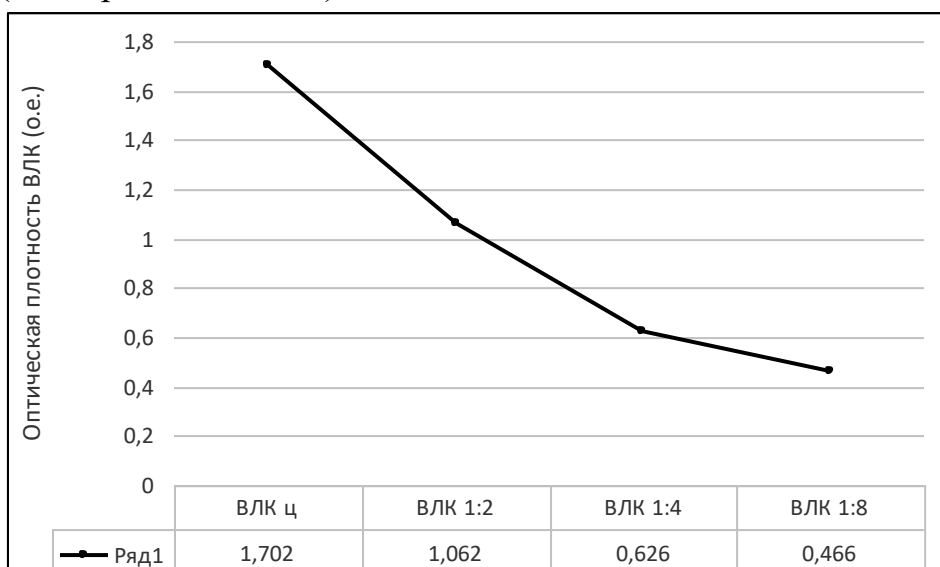


Рисунок 4.5 - График титрования ВЛК для подбора рабочего разведения. Согласно инструкции к набору «Векто-РубеллаIgG», учет результатов количественного определения можно производить в том случае, если

содержание IgG к вирусу краснухи в контрольном образце соответствует указанному диапазону на этикетке флакона, в нашем случае мы получили концентрацию в КО 43,8 МЕ/мл, что соответствует указанному диапазону на этикетке флакона (32-51 МЕ/мл). Для дальнейших исследований был выбран ВЛК (разведение 1:2), поскольку значения ОП находились в диапазоне от 0,803 до 1,034 о.е., что соответствует концентрациям от 35,1 до 42,3 МЕ/мл. Эти параметры удовлетворяют следующим критериям отбора:

- не попадает на ближайшую точку калибратора 50 МЕ/мл,
- находится в пределах 0,5-1,5 о.е.,
- находится в диапазоне от 2,8 до 3,4 ОП cut-off (в данном наборе это калибровочный образец 10МЕ/мл).

Был приготовлен ВЛК разведенный в два раза в большом объеме из расчета для проведения серии предварительного тестирования и для дальнейшего использования при тестировании сывороток крови пациентов. В дальнейшем именно он обозначен как ВЛК.

Была проведена оценка корреляционной связи между измеренными значениями ОП ВЛК и вычисленными значениями концентрации (рисунок 4.6) с целью определить возможность использовать значения ОП и МЕ/мл

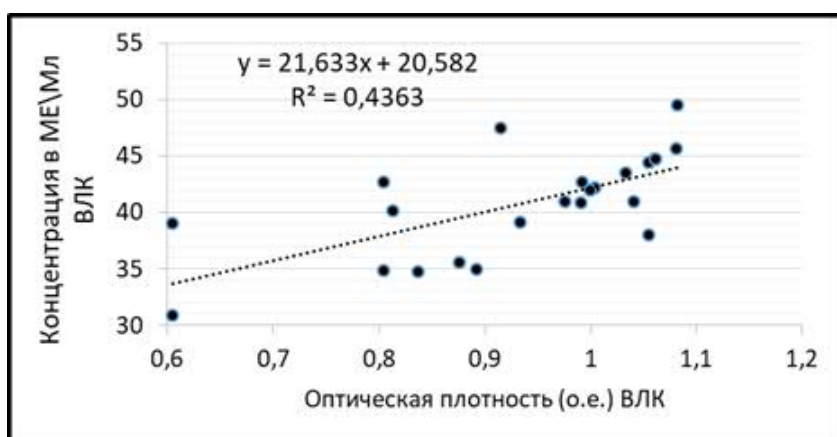


Рисунок 4.6 - Корреляция между оптической плотностью и концентрацией при измерении разведений «ВЛК Рубелла-IgG»

для проведения процедуры контроля качества. R^2 оказался равным 0,436, что говорит о положительной корреляции слабой силы. Полученные результаты позволяют сделать заключение о возможности использования ВЛК как для

качественного (ОП о.е.) так и количественного (МЕ/мл) способа учета результатов.

4.2.2 Определение некоторых параметров вариационной статистики тестирования «ВЛК Рубелла-IgG»

Калибровочные образцы и контрольный образец набора реагентов для определения концентрации антител класса IgG к вирусу краснухи, не подвергаются процедуре разведения в процессе постановки анализа, тогда как исследуемые образцы и ВЛК при постановке разводятся 1:100. При этом разведение образцов крови проходит в два этапа, сначала образец разводится 1:10 в вспомогательном планшете, далее разведенный 1:10 образец разводится в рабочем планшете еще в 10 раз. В связи с этим была сформулирована задача определить CV как для калибраторов и КО, так и для препарата ВЛК. Для этого были использованы данные 20 аналитических серий каждого исследуемого материала и рассчитаны их средние значения и CV в ОП (о.е.) и концентрации (МЕ/мл) (таблица 4.5).

Таблица 4.5 - Результаты средних значений и коэффициента вариации оптической плотности калибровочных образцов, контрольного образца, входящего в состав набора и ВЛК и их концентраций.

	0	10	50	200	800	КО		ВЛК	
	МЕ/мл	МЕ/мл	МЕ/мл	МЕ/мл	МЕ/мл	ОП	МЕ/мл*	ОП	МЕ/мл
Сред.	0,029	0,238	1,043	2,295	3,267	0,986	42,5	0,833	39,8
CV,%	19,8	20,4	20,5	13,1	2,6	21,8	9,8	17,6	13,1
X+2S	0,04	0,336	1,471	2,899	3,437	1,418	50,8	1,195	50,2
X-2S	0,017	0,141	0,615	1,692	3,097	0,554	34,2	0,572	29,4
X+3S	0,046	0,385	1,685	3,201	3,437	1,634	54,9	1,351	55,4
X-3S	0,011	0,092	0,401	1,39	3,097	0,338	30,0	0,416	24,2

Примечание: * по паспорту к набору концентрация IgG в КО 41,4 МЕ/мл при пределе 32-51 МЕ/мл

Из таблицы следует, что CV для калибраторов 0, 10 и 50 МЕ/мл CV достоверно не отличается и равно 19,8; 20,4 и 20,5 % соответственно. CV контрольного образца в ОП равен 21,8%. Для калибратора 200 МЕ/мл CV

равен 13,1%, а для калибратора 800 МЕ/мл CV - 2,6 %. Иными словами, CV для ОП от 0,029 до 1,043 составил около 20 %. Следовательно, чем ниже ОП, а значит и концентрация образца, тем выше CV. Интересно, что для калибратора, выполняющего роль cut-off (10 МЕ/мл), CV равен 20,4%, а в инструкции нет «серой зоны», результат выдается либо положительный либо отрицательный. Имея такой CV в области cut-off для образцов с низкой концентрацией аналита при повторных постановках могут получаться разноречивые результаты: как положительные, так и отрицательные. Поэтому мы рекомендуем использовать понятие «серой зоны» для определения антител класса IgG к вирусу краснухи, равной $\pm 20\%$, хотя это и не прописано в инструкции.

CV для контрольного образца по ОП получили равным 21,8%, а для концентрации в МЕ/мл 9,8%. Для ВЛК CV для ОП составил 17,6%, а для концентрации в МЕ/мл - 13,1% (см. таблицу 4.5).

Полученные данные согласуются с результатами, полученными при исследовании препарата «ВЛК Корь-IgG». Это также свидетельствует в пользу правильности выбора для дальнейшей работы разведения 1:2 препарат «ВЛК Рубелла-IgG».

4.2.3 Проведение внутрилабораторного контроля качества с помощью «ВЛК Рубелла-IgG»

Проведение ВКК осуществляли в три стадии:

Стадия 1 – оценка сходимости результатов измерений ВЛК;

Стадия 2 - оценка воспроизводимости результатов измерений ВЛК и построение контрольных карт;

Стадия 3 – проведение оперативного внутрилабораторного контроля качества.

Стадия 1. Оценка сходимости результатов измерений ВЛК.

Были проведены 10 измерений вариантов ВЛК в одной аналитической серии на одном планшете [20,246]. Результаты учитывали качественным (ОП (о.е)) и количественным (МЕ/мл) способами. Исходя из полученных 10

значений был рассчитан CV_{10} для ВЛК, который оказался равным 7,4% для качественного (ОП (о.е.)) и 7,8% для количественного учета (МЕ/мл).

Стадия 2. Оценка воспроизводимости результатов измерений ВЛК и построение контрольных карт.

На второй стадии проводили по 20 измерений ВЛК. Для сокращения времени набора необходимых данных для построения контрольной карты измерения проводили два раза в день в течение 10 дней. Измеряли ОП (о.е.) ВЛК и рассчитывали концентрацию (МЕ/мл). По результатам рассчитывали средние показатели ОП (о.е.) и МЕ/мл, S и его контрольные пределы $\pm 1S$, $\pm 2S$, $\pm 3S$ и CV_{20} [20,81, 86]. По полученным результатам были построены контрольные карты для ВЛК по показателям ОП (о.е.) и концентрации (МЕ/мл) (таблица 4.6). При дальнейшей работе необходимо ориентироваться на полученные нами данные по CV для ОП 17,6%, для концентрации в МЕ/мл 13,1%.

Таблица 4.6 - Параметры для построения контрольной карты.

Показатель	ВЛК	
	ОП	МЕ/мл
Х ср ВЛК	0,833	39,8
Ст. откл(S)	0,156	5,203
CV, %	17,6	13,1
X+1S	0,989	45,0
X-1S	0,677	34,6
X+2S	1,195	50,2
X-2S	0,572	29,4
X+3S	1,351	55,4
X-3S	0,416	24,2

Стадия 3. Проведение оперативного внутрилабораторного контроля качества.

Серологическое исследование 654 сывороток крови методом ИФА проводили с использованием охарактеризованном выше препарате ВЛК. Все точки ВЛК, для качественного ОП (о.е.) и количественного вариантов (МЕ/мл), наносили на построенные контрольные карты (рисунки 4.7 и 4.8) и

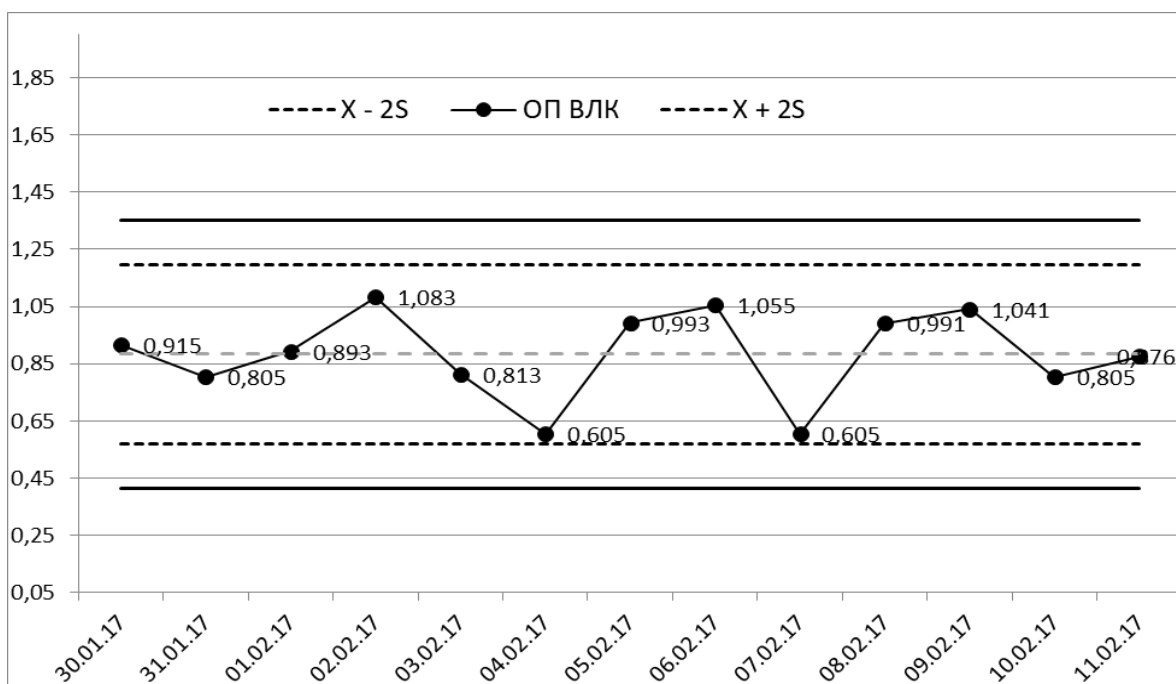


Рисунок 4.7 - Оперативный контроль качества для определения концентрации антител класса IgG к вирусу краснухи. По оси ординат отложена ОП ВЛК. По оси абсцисс- номер обследования

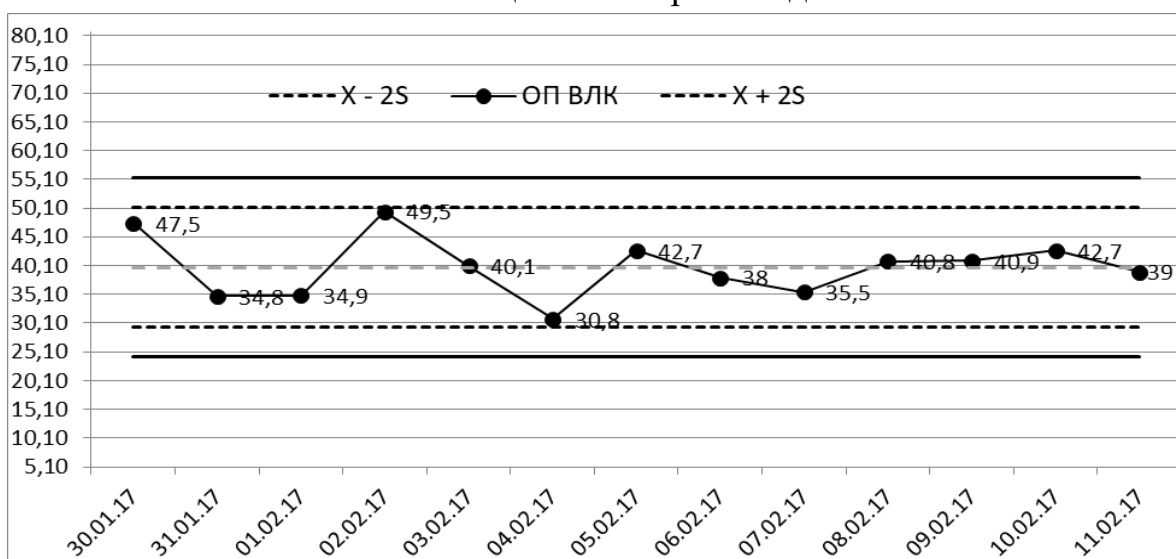


Рисунок 4.8 - Оперативный контроль качества для определения концентрации антител класса IgG к вирусу краснухи. По оси ординат отложена концентрация в МЕ/мл ВЛК «ВектоРубелла-IgG». По оси абсцисс- номер обследования.

оценивали приемлемость полученных результатов с применением контрольных правил Вестгарда [18, 81]. Полученные результаты находились в соответствии с контрольными правилами. При использовании ВЛК была доказана правильность работы всей аналитической серии в целом, учитывая

все стадии проведения иммуноферментного анализа и используемого оборудования, так как не были нарушены контрольные правила, что свидетельствует о практической пригодности контрольного материала «ВЛК Рубелла-IgG» при использовании его в виде разведенного 1:2 (ВЛК).

Таким образом, в результате проведенной работы удалось показать, что использование аттестованных на базе референс-лаборатории ЕРБ ВОЗ ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского» контрольных образцов «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG», содержащих антитела класса IgG к вирусу кори и краснухи соответственно, для проведения ВКК при исследовании сывороток крови на наличие IgG-антител к вирусу кори или краснухи методом ИФА на наборах «ВектоКорь-IgG» и «ВектоРубелла-IgG», позволяет повысить надежность и качество метода и исключить некоторые ошибки при проведении исследований. Несомненным преимуществом использования препаратов «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG» является то, что один и тот же препарат может быть использован как при количественном (МЕ/мл), так и при качественном формате (ОП о.е.) постановки эксперимента.

На первом этапе были подобраны разведения контрольных образцов «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG» так, чтобы интервал определения оптической плотности для них находился в линейной области от 0,5 до 1,5 о.е. Для «ВЛК Корь-IgG» эти параметры соответствовали цельному препарату, тогда как для «ВЛК Рубелла-IgG» - разведению препарата 1:2. Так же было показано, что для контрольных образцов, которые будут использоваться для построения контрольных карт и проведения оперативного контроля необходимо подобрать не только интервал оптической плотности, но и отследить, что бы рассчитанная концентрация контрольного образца не находилась в зоне значений (точек) калибровочных образцов, входящих в состав набора реагентов, по которым строится калибровочный график от точки к точке.

На втором этапе был получен коэффициент вариации сходимости для качественного учета 8,0%, и для количественного учета 7,1 % для «ВЛК Корь-

IgG». Для «ВЛК Рубелла-IgG» эти показатели составили для качественного учета 7,4 %, для количественного учета 7,8%. Эти результаты хорошо согласуются с коэффициентом вариации (не более 8%), указанным в инструкции к наборам «ВектоКорь-IgG», «ВектоРубелла-IgG» (АО Вектор-Бест), а так же в ГОСТ Р 51352-2013 [15.]. Так же мы рассчитали CV (воспроизводимость) для построения контрольных карт, для контрольного образца «ВЛК Корь-IgG» значения CV не должен превышать для качественного учета результатов 19,0% и 16,4 % для количественного учета результатов. Для контрольного образца «ВЛК Рубелла-IgG» значения CV не должен превышать для качественного учета результатов 17,6%, для количественного 13,1 %. Каждая лаборатория должна обязательно определять коэффициент вариации при исследовании антител класса IgG к вирусу кори и краснухи и информировать врача эпидемиолога о достоверности выдаваемого результата. Согласно ГОСТ Р 53022.3-2008 [19] значения результатов лабораторных исследований отражают содержание искомых аналитов с некоторой степенью неопределенности, вызванной факторами случайных и систематических погрешностей аналитических процедур. Поэтому, особенно в области принятия решения, необходимо учитывать полученное значение коэффициента вариации воспроизводимости в каждой лаборатории.

При тестировании сывороток крови пациентов на антитела класса IgG вирусам кори и краснухи были использованы контрольные материалы «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG», значения которых наносили на контрольные карты и оценивали с помощью контрольных правил, прописанных в приказах РФ [81, 86]. Ни одного нарушения выявлено не было, что подтверждает качественную работу всей аналитической системы и пригодность приготовленных контрольных материалов для использования в работе всей лабораторной сети.

5.1 Особенности гуморального иммунитета к вирусам кори и краснухи.

Известно, что после заболевания корью и краснухой появляется длительный, практически пожизненный иммунитет. По данным литературы [200], лица, переболевшие корью даже за 65 лет до повторного контакта с вирусом, корью не заболевают. Специфические антитела, циркулирующие в крови переболевших практически в течение всей их жизни, являются основным фактором сохранения невосприимчивости к этим инфекциям. Это подтверждается и на основании многолетних серологических обследований лиц, переболевших корью и краснухой. Специфические антитела после вакцинации так же предохраняют от заболевания. Современные живые противовирусные вакцины стимулируют антителообразование у 90-97 % иммунизированных лиц [25]. Объективно оценить ответ на вакцинацию можно только при проведении серологического обследования населения. В зависимости от поставленной цели исследований состояния противокоревого и противокраснушного иммунитета подбирается разный возрастной состав населения и периодичность обследования [96]. В настоящее время, по рекомендациям ВОЗ, основным методом в проведении таких обследований является метод ИФА.

Согласно основополагающему документу по проведению серомониторинга [45], в России ежегодно обследуют привитых лиц разного возраста на всех территориях РФ с целью оценки поствакцинального иммунитета. В настоящей работе мы проводили обследование детей и взрослых без учета прививочного анамнеза для оценки состояния популяционного иммунитета.

В связи с вышеизложенным, на первом этапе работы было проведено исследование состояния гуморального иммунитета против кори и краснухи в одном регионе (Москва и Московская область) и сопоставление этих данных с заболеваемостью корью на этих территориях. При анализе различных

возрастных групп по уровню восприимчивости к коревой коревой инфекции было обнаружено, что самый высокий процент серонегативных в возрасте 18-30 лет - 42,5%. При этом снижение этого показателя отмечается после 30 лет. Наши исследования дают основания предположить, что происходит это за счет увеличения числа переболевших. Подобное явление можно объяснить тем, что защиту против кори осуществляют не только специфические антитела, но и специфические цитотоксические Т-лимфоциты (клеточный компонент иммунитета). В ответ на инфекцию или вакцинацию против кори формируются специфические цитотоксические Т-лимфоциты, которые долгие годы сохраняются в организме иммунного человека [122]. Специфические цитотоксические Т-лимфоциты и антитела независимо сохраняются в организме, поэтому можно допустить, что часть привитых в детстве утративших антитела в процессе жизни взрослых, еще сохраняют клеточный компонент защиты и не заболевают корью. Данные условного разделения на переболевших и привитых по количественному признаку IgG антител в вирусу кори свидетельствует о том, что в группе взрослых старше 50 лет доля переболевших корью увеличивается до 90%. Такую точку зрения высказывает также группа авторов из Тайланда [239] Другая группа авторов показала [169], что иммунитет к кори является сложным и зависит как от гуморального, так и от клеточного ответа. Кроме того, было отмечено, что у значительной доли вакцинированных лиц, не детектируются специфические антитела. Но при этом определяются специфические Т-лимфоциты, что свидетельствует о важной роли клеточного иммунитета в защите от кори.

Сопоставление процента серопозитивных лиц с долей заболевших корью в различных возрастных группах выявило сильную отрицательную корреляцию ($r = - 0,76$). Например, снижение в возрастной группе 18-30 до 57,5% уровня серопозитивных лиц сопровождалось увеличением количества заболевших в этой группе до 28%, а снижение заболеваемости корью до 2,9% в возрастной группе 51-60 лет обеспечивалось и увеличением доли серопозитивных к кори до 95%.

Наши исследования показали, что среди детей и подростков не было выявлено лиц, отвечающих на коревую инфекцию вторичным иммунным ответом. Это значит, что среди больных корью детей и подростков не выявлено ни одного, кто был привит от кори и заболел этой инфекцией, а все дети и подростки, заболевшие корью, не были привиты от кори и поэтому заболели. При этом взрослых больных можно четко разделить на 2 подгруппы: отвечающие на инфекцию первичным иммунным ответом (80-90%) и реагирующие на корь вторичным иммунным ответом (10-20%). Следует отметить, что первичный иммунный ответ дают ранее не привитые люди. Однако в эту же группу могут попасть и те, кому вакцинация была сделана с нарушением правил, а также лица с первичными вакцинальными неудачами. Причинами заболеваемости корью привитых в детстве взрослых, могут быть как вторичные вакцинальные неудачи, так и отсутствие бустирования диким вирусом привитых из-за снижения интенсивности циркуляции вируса на этапе элиминации кори [118]. Группа заболевших корью привитых в детстве взрослых, по нашим уловным серологическим критериям оценки, оказалась достаточно большой, в нее вошли пациенты в возрасте от 18 до 40 лет. Таким образом, с возрастом, в условиях спорадической заболеваемости корью, в нее рискует попасть каждый пятый (десятый) добросовестно привитый в детстве взрослый.

Наши исследования показали, что для оценки состояния популяционного иммунитета целесообразно обследовать разные возрастные группы без учета прививочного анамнеза для последующей вакцинации серонегативных. Такой подход дает намного больше сведений для понимания процессов поддержания уровня коллективного противокорьевого иммунитета. Учитывая ошибку достоверности выборочных исследований, целесообразно продолжить эти исследования в будущем, что позволит подтвердить или опровергнуть наличие тенденции утраты поствакцинального иммунитета в процессе жизни в условиях спорадической заболеваемости корью.

Для углубленного анализа состояния коллективного противокорьевого иммунитета в возрастной группе 18-30 лет было решено целенаправленно исследовать иммунитет к вирусу кори именно в этой возрастной группе с последующей вакцинацией тех, кто не имел специфических антител к вирусу кори, и оценкой у них поствакцинального иммунитета. Параллельно у пациентов этой группы мы определили наличие специфических антител к вирусу краснухи. В результате наших исследований серонегативными к антигенам вируса кори оказались 68%, а к вирусу краснухи только 5% лиц этой возрастной группы. Все серонегативные к кори были привиты коревой вакциной, но только у 50 из 100 первоначально включенных в исследование человек был исследован поствакцинальный иммунитет. Следует отметить, что у всех 50 здоровых взрослых, которые первоначально не имели специфических антител к вирусу кори, после вакцинации против кори появились специфические антитела класса IgG. Следовательно, отсутствие этих антител на начало обследования не может быть объяснено первичной вакцинальной неудачей, когда специфические антитела вообще не формируются. Показано, что существует генетическая предрасположенность к преобладанию гуморального или клеточного типа иммунного ответа на конкретный антиген. Полагают, что это связано с индивидуальной особенностью HLA-антигенов конкретного человека, т.к. именно они отвечают за презентацию вирусного антигена Т-клеткам, тогда как В-клетки в такой презентации не нуждаются [244]. Также показано, что индивидуальные различия в уровнях продукции ключевых цитокинов влияют на уровень иммунного ответа на коревые антигены [196].

При анализе спектра субклассов специфических IgG-антител было показано, что 24 человека из 50 (48,0 %) изначально серонегативных ответили на прививку первичным типом иммунного ответа, в этой группе преобладали антитела IgG3-субкласса. Можно предположить, что эти люди не были привиты в детстве от кори. Тогда как 26 (52,0 %) человек ответили по вторичному типу. Это означает, что эти люди были привиты от кори в детстве,

но утратили в процессе жизни противокоревые антитела. По-видимому, у них сохранились В-клетки памяти. Эти клетки со времени вакцинации в детстве несут перестроенные рецепторы, преимущественно IgG1-субкласса, но никак себя не проявляют, пока есть антитела и нет повторной встречи с вирусом. Поэтому, при проведенной нами вакцинации (а для этой когорты – ревакцинации), эти «дремлющие» В-клетки памяти быстро активировались, воссоздали популяцию плазматических клеток с уже перестроенным рецептором, которые быстро начали синтезировать специфические антитела преимущественно IgG1-субкласса, что характерно для вторичного типа иммунного ответа.

Таким образом, группу серонегативных к антигенам вируса кори взрослых до вакцинации по спектру субклассов IgG-антител, образовавшихся после вакцинации против кори мы условно разделили на две подгруппы: вакцинированных в детстве (52%) и не вакцинированных (48%). Однако, у более чем 60% лиц, отнесенных по результатам тестирования в группу непривитых, имелись сведения о двукратной прививке в детстве, в соответствии с национальным календарем прививок. С чем связано такое расхождение между лабораторными результатами и записями в картах о прививках? Как обсуждалось выше, все эти люди ответили на нашу вакцинацию, что подтверждается лабораторным методом, т.е. у каждого человека были определены специфические антитела к вирусу кори, следовательно, их нельзя отнести к группе первичных вакцинальных неудач, когда нет ответа на прививку. Можно предположить, часть этих людей составляют группу вторичных вакцинальных неудач, когда иммунный ответ на вакцину формируется, но быстро пропадает. Заргарьянц А.И. с группой авторов [25] в своей работе показали, что суммарно первичные и вторичные вакцинальные неудачи составляют 10,8-12,7 % после первой вакцинации и 13,7-17,1% после ревакцинации. Вторичные вакцинальные неудачи составляют около 5%, т.е. таких людей не настолько много. С другой стороны, вакцинацию против кори проводят в возрасте 1 год, когда иммунная система

ребенка находится в начальной стадии своего развития [121]. Процессы формирования и созревания иммунной системы идут неодинаково у разных людей, поэтому в этом возрасте возможны проблемы с формированием и поддержанием долговременной иммунологической памяти. Ревакцинация, согласно календарю прививок РФ проводится в 6 лет, когда иммунная система уже более зрелая, но, к сожалению, не все дети получают вторую дозу вакцины. Кроме того, можно предположить, что часть этих людей была привита с нарушениями или некачественной вакциной, поскольку это люди, родившиеся в 90-ые годы прошлого века, а в это время наша медицина, как и вся страна, испытывала серьезные трудности с финансированием. И, наконец, существует вероятность, что записи о прививке не соответствовали реальности, что иногда случается.

На следующем этапе было проведено сопоставлении гуморального иммунного ответа на вирус кори у больных и привитых взрослых. Как было показано ранее, в возрасте 18-30 лет выявлен самый большой процент серонегативных к кори людей. Оказалось, что люди в этой возрастной группе чаще заболевают корью, чем более взрослые группы населения. Известно, что в острой фазе заболевания корью не привитые взрослые реагируют преимущественно IgG3-антителами низкой авидности (первичный иммунный ответ), а привитые в детстве взрослые в случае заболевания корью отвечают высокоавидными антителами IgG1-субкласса (вторичный иммунный ответ) [117]. Поэтому мы проанализировали гуморальный иммунный ответ у 50 человек заболевших корью и у 50 человек, вакцинированных против кори в возрасте от 20 до 55 лет. Более половины привитых от кори здоровых серонегативных взрослых и больных этой инфекцией ответили на контакт с вирусом кори вторичным типом иммунного ответа, согласно спектру субклассов и авидности сформировавшихся специфических антител. Это означает, что эти люди, по-видимому, были привиты в детстве от кори, но потеряли в процессе жизни долгоживущие плазматические клетки, синтезирующие противокоревые антитела. Однако у них сохранились В-

клетки памяти, сформировавшиеся при вакцинации в детстве и имевшие перестроенные В-клеточные рецепторы преимущественно IgG1-субкласса.

Ранее было показано, что созревание специфического гуморального иммунного ответа на прививку против кори у детей сопровождалось переключением с первичного иммунного ответа, для которого характерны низкоавидные IgG3-антитела на ответ сформированных клеток памяти, для которых типичен вторичный тип иммунного ответа с высокоавидными IgG1-антителами [115]. Такое переключение обусловлено тем, что ранние короткоживущие плазматические клетки, синтезирующие низкоавидные IgG3-антитела, постепенно вытесняются долгоживущими плазматоцитами, для которых характерны высокоавидные IgG1-антитела [118]. Среди наших взрослых пациентов ответивших первичным типом иммунного ответа ограниченная группа имела парные сыворотки. Первые сыворотки были взяты у больных корью через 6 дней от начала высыпаний и вторые сыворотки через 3 недели. Нам удалось показать аналогичный процесс переключения с раннего первичного IgG3-типа иммунного ответа на зрелый IgG1-тип, характерный для иммунологической памяти для взрослых коревых пациентов, подобному тому, что было обнаружено у детей, привитых против вируса кори.

В нашем исследовании было показано, что 2/3 заболевших взрослых отвечали на вирус кори в острую фазу заболевания вторичным типом иммунного ответа. Это доказывает, что привитые в детстве взрослые реально болеют корью в случае утраты противокоревых антител. В США описаны вспышки кори, где среди заболевших, помимо непривитых, выделяется группа (46%) привитых и даже получивших 2 дозы вакцины [164].

Популяционные исследования наличия противокоревых антител, проводимые несколькими группами авторов в различных возрастных группах показывают, что в возрастной группе 18-35 лет значимо возрастает количество серонегативных лиц [10, 20, 56]. Такая большая серонегативная прослойка создает угрозу заболевания корью молодых взрослых, которые, будучи молодыми родителями, могут инфицировать своих маленьких, еще не

привитых от кори детей. Более того, эта возрастная группа является наиболее мобильной, часто проживает в условиях тесно сплоченных коллективов (студенческие и рабочие общежития, армейские казармы) и может являться группой высокого риска инфицирования. В условиях внутренней миграции повышается риск возникновения локальных вспышек кори.

Наши исследования показали, что вакцинация против кори серонегативных взрослых приводит к формированию специфических антител как у впервые вакцинированных, так и у вакцинированных в детстве, но утративших противокоревые антитела. Среди 100 привитых серонегативных взрослых разного возраста не было выявлено ни одного случая реакций на прививку и все 100 человек сформировали противокоревые IgG-антитела после прививки. Результаты проведенного исследования поднимают вопрос о необходимости контроля уровня антител против вируса кори среди школьников 10-11 классов с последующей ревакцинацией выявленных серонегативных. Наше исследование продемонстрировало, что даже первичный ответ на коревую вакцину у взрослых дает высокие уровни антител. Это дает надежду, что в случае вакцинации серонегативных 11-тиклассников, мы сможем иметь высокий процент иммунной прослойки среди взрослых. Вывод о необходимости вакцинации серонегативных лиц среди взрослого контингента до 35 лет был также сделан рядом независимых исследователей, изучавших состояние коллективного иммунитета среди людей разного возраста [97, 127].

В то же время на сегодняшний день, прививка в возрастной группе старше 50 лет не выглядит целесообразной, так как по нашим данным практически все люди в этой возрастной категории имеют антитела против кори и краснухи, полученные тем или иным путем. Тем не менее, следует продолжать исследования состояния коллективного иммунитета в разных возрастных группах для принятия решений по оптимизации тактики вакцинации с целью предупреждения накопления восприимчивых к кори лиц и достижения устойчивых показателей элиминации этой инфекции.

5.2 Внутрिलाбораторный контроль качества при определении IgG-антител к вирусам кори и краснухи методом иммуноферментного анализа.

Для серологического тестирования пациентов, с целью определения специфических антител к вирусу кори и краснухи, используют иммуноферментный анализ, как в количественном, так и качественном формате определения. Метод ИФА остается наиболее практичным методом для мониторинга и при диагностике инфекции и рекомендован ВОЗ. При этом метод ИФА является экономичным и удобным для одновременного тестирования множества образцов. На результат, полученный методом ИФА, влияет много факторов. Сам метод ИФА содержит несколько ключевых процедур выполнения анализа, таких как разведение сывороток, инкубация с сыворотками, конъюгатом, с раствором ТМБ, промывки между инкубациями. Дополнительную вариабельность вносит смена лотов реагентов или персонала лаборатории, приборная база, температура окружающей среды, качество дистиллированной воды. Каждый из перечисленных этапов аналитических процедур может давать свои случайные и систематические погрешности. Поэтому результаты серологического тестирования на корь и краснуху необходимо постоянно контролировать с использованием контрольных препаратов (ВЛК). Для получения достоверных результатов, особенно в области принятия решения, необходимо учитывать полученное значение коэффициента вариации в каждой лаборатории [19].

Мониторинг качества с использованием внешнего контрольного препарата, отличного от контрольных образцов из набора реагентов, может помочь обнаружить и уменьшить ошибки в процессе тестирования в лаборатории. В конечном итоге это приводит к улучшению качества анализов, выполняемых в лаборатории. Немаловажное значение имеет возможность сопоставления результатов, полученных в разных региональных центрах. Нами был отработан алгоритм применения внешних контрольных препаратов для внутрिलाбораторного контроля качества - «ВЛК Корь-IgG» при

тестировании сывороток крови на наличие IgG-антител к вирусу кори и «ВЛК Рубелла-IgG» при тестировании сывороток крови на наличие IgG-антител к вирусу краснухи методом ИФА. Преимуществом препаратов «ВЛК-корь IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG» является то, что один и тот же препарат можно использовать и при качественном, и при количественном формате проводимых исследований. При разработке контрольных препаратов необходимо было определить основные критерии для ВЛК, т.е. в первую очередь диапазон оптической плотности, коэффициент вариации для сходимости и воспроизводимости. В приказах и ГОСТах РФ нет четких рекомендаций относительно величины ОП (о.е.) для ВЛК, используемого в ИФА для определения коревых и краснушных IgG. В ГОСТе Р 53133.2-2008, часть 2 [20] регламентируется понятие о нормальном и патологическом значении антител, но для задачи определения концентрации антител к вирусу кори или краснухи у здоровых или больных лиц это неприменимо. Группа J.Kim предлагает использовать 2 образца ВЛК с разной ОП, один из которых, близкий к значению cut-off, для определения чувствительности тест-систем [216]. В руководстве по лабораторной диагностике кори и краснухи ВОЗ рекомендует использовать рабочее разведение контрольного материала в пределах 2-3 cut-off для неколичественных методов определения IgM [300]. И.Г.Нетесова с соавторами для контрольного материала при определении HBsAg и антител к вирусу гепатита С, ВИЧ и возбудителю сифилиса использовала значения ОП (о.е.) в пределах 0,5-1,5 о.е, а CV сходимости от 11 до 15 % [48]. CV, согласно ГОСТ Р 53133.1-4-2008, не должен превышать 25% для количественных методов [20]. Этот показатель также подтвержден в ГОСТе Р 51352-2013 [15]. Таким образом, мнения о необходимых характеристиках ВЛК весьма разрознены и противоречивы, более того, эти рекомендации относятся только к качественным методам оценки иммуноферментного анализа. В связи с вышеизложенным, проведенные исследования были сосредоточены на валидации препаратов «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG», при определении IgG-антител к антигенам вирусов

кори и краснухи в сыворотке крови методом ИФА с помощью тест-систем «ВектоКорь-IgG» и «ВектоРубелла-IgG» и на разработке параметров учета для качественного (ОП о.е.) и количественного (МЕ/мл) форматов проводимых исследований.

Сначала был отработан алгоритм для «ВЛК Корь-IgG», а далее провели исследование и с препаратом «ВЛК Рубелла-IgG». Для этого были исследованы два варианта препарата «ВЛК Корь-IgG»: цельный (ВЛК₁), который по нашим данным имеет среднее значение оптической плотности $0,896 \pm 0,152$ о.е. (согласно паспортным данным ВЛК имеет значение ОП $0,811 \pm 0,132$) и два варианта ВЛК, разведенного 1:2 (ВЛК₂ и ВЛК_{2*}) со средней оптической плотностью $0,534 \pm 0,083$ и $0,298 \pm 0,053$ о.е. Долгов В.В с соавт. в своей книге подчеркивает различия в погрешностях спектрофотометров при измерении аналита в разных интервалах оптической плотности. Авторы рекомендуют рабочий (линейный) интервал измеряемых оптических плотностей, равный 0,2 – 2,0 о.е., а также указывают, что при ОП меньше 0,2 о.е. погрешность измерения резко возрастает [21]. Значения ОП использованных в работе ВЛК₁ и ВЛК_{2*} попадают в линейный интервал. При этом ВЛК₁ соответствует критериям, предложенным Нетесовой И.Г. с соавторами [48] - 0,5-1,5 о.е., а показатели ВЛК_{2*} - критериям ВОЗ, соответствующим ОП в пределах в 2-3 cut-off (среднее значение cut-off равно 0,108 о.е.), что составило 0,38 о.е., причем это значение также находится в линейной области.

Используя оба контрольных препарата, мы рассчитали коэффициент вариации для сходимости и воспроизводимости, построили контрольные карты и провели оперативный контроль при тестировании сывороток. При расчете коэффициента вариации воспроизводимости для построения контрольной карты выявили, что, если значение концентрации антител в контрольном препарате попадает на точку калибратора, то CV возрастает в 2,6 раза. Получив значение CV для ВЛК₂, равное 26,7 %, мы учли эту информацию и приготовили ВЛК_{2*} с CV, равным 10,6 % (см. таблицу 4.2). И

этот показатель явился еще одним критерием для определения характеристик ВЛК. В результате проведенных исследований было показано, что для оценки сходимости результатов, построения контрольных карт и проведения оперативного контроля следует использовать цельный «ВЛК Корь-IgG» (ВЛК₁) с ОП $0,896 \pm 0,152$ о.е., поскольку эти значения оказываются в линейной области калибровочной кривой. Концентрация IgG- антител к вирусу кори в цельном препарате «ВЛК Корь-IgG» составляет $0,811 \pm 0,132$ МЕ/мл. Следовательно, она не попадает на точки калибратора с концентрацией 0,5 или 1 МЕ/мл. Для оценки чувствительности метода следует использовать «ВЛК Корь-IgG», разведенный 1:2 с ОП (о.е.) равный 2-3 cut-off, поскольку эти значения также находятся в линейной области калибровочной кривой, что позволяет точнее интерпретировать результаты с низкими концентрациями исследуемого анализата, близкими к точке принятия решения.

Аналогичный подход мы применили для подбора разведения контрольного препарата «ВЛК Рубелла-IgG» при проведении лабораторных исследований сывороток крови на наличие антител класса IgG к вирусу краснухи. Для оценки сходимости результатов, построения контрольных карт и проведения оперативного контроля мы предлагаем использовать разведенный в два раза препарат «ВЛК Рубелла-IgG» с ОП, равной $0,833 \pm 0,156$ о.е., поскольку эти значения оказываются в линейной области калибровочной кривой. Концентрация IgG-антител к вирусу краснухи в этом препарате составляет $39,8 \pm 5,2$ МЕ/мл, не попадая на точку калибратора с концентрацией 50 МЕ/мл.

Проведение контроля качества с использованием ОП (о.е.) для ВЛК позволит заметить снижение или увеличение оптической плотности для результатов всего планшета (например, при снижении температуры инкубации или уменьшении времени инкубации), т.е. это позволит увидеть сразу ошибку при проведении ИФА. В то же время при количественном варианте (МЕ/мл) данный процесс будет нивелирован снижением ОП (о.е.) тестовых калибровочных образцов, что приведет к изменению и всей калибровочной

кривой и расчетные концентрации будут правильными. Но в этом случае можно не заметить нарушения процедур проведения ИФА. Тем не менее, в обоих случаях результаты пациентов будут достоверными, так как в случае качественного формата, результат выдается либо положительный, либо отрицательный, либо сомнительный, причем статус полученного результата зависит от ОПкрит. Но в наборах «ВектоКорь-IgG» и «ВектоРубелла-IgG» ОПкрит. не рассчитывается от ОП (о.е.) отрицательного контроля и некоего постоянного коэффициента, а равен измеряемой в каждом протоколе ОП (о.е.) калибровочного образца соответствующего 0,15 МЕ/мл и 10 МЕ/мл.

В результате выполненных исследований были разработаны критерии оценки при проведении внутрилабораторного контроля качества, а именно, показатели сходимости и воспроизводимости результатов тестирования препаратов для оперативного контроля «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG». По нашим данным, значения CV для сходимости не должны превышать 8%, для воспроизводимости - 19% (здесь рекомендуется уровень по максимальному значению, так как у нас были получены результаты для качественного формата от 17,6 до 19,0 %, для количественного учета результатов - от 13,1 до 16,8 %).

При проведении оперативного контроля необходимо обращать внимание на контрольные правила, используя которые можно увидеть любое смещение полученных результатов, вызванное случайными или систематическими ошибками. Можно также увидеть и различия между лотами тест-систем, между разными операторами в одной лаборатории и вариацию результатов ВЛК между разными лабораториями. Мы полностью охарактеризовали препараты для проведения внутрилабораторного контроля качества для использования в региональных центрах. Препараты «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG» одобрены Национальным научно-методическим центром ЕРБ ВОЗ (ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского»), доступны бесплатно для лабораторий региональных центров. При использовании единого контрольного препарата каждая лаборатория может сравнить свои результаты

с результатами, полученными другими лабораториями и в случае необходимости скорректировать свою работу.

5.3 Алгоритм проведения внутрилабораторного контроля качества при определении IgG-антител к вирусам кори и краснухи методом иммуноферментного анализа на примере тест-систем «ВектоКорь-IgG» и «ВектоРубелла-IgG».

1. Контрольные препараты.

Для оценки соответствия анализа заданным параметрам проведения внутрилабораторного контроля качества необходимо использовать контрольные препараты. Согласно инструкции «ВЛК Корь-IgG» (лиофильно высушенный препарат, содержащий IgG к вирусу кори) восстанавливают путем добавления 200 мкл дистиллированной воды во флакон лиофилизатом препарата и тщательно перемешивают. Препарат готов к работе.

Препарат «ВЛК Рубелла-IgG» (лиофильно высушенный препарат, содержащий IgG к вирусу краснухи), восстанавливают путем добавления 200 мкл дистиллированной воды во флакон с лиофилизатом препарата и тщательно перемешивают. Далее готовят разведение ВЛК 1:2, используя сыворотку крови человека, не содержащую антитела класса IgG к вирусу краснухи. Препарат готов к работе.

При последующих исследованиях препараты «ВЛК Корь-IgG» цельный и «ВЛК Рубелла-IgG», разведенный 1:2 проходят те же стадии пробоподготовки, как описано в инструкции к тест-наборам «ВектоКорь-IgG» и «ВектоРубелла-IgG» производства АО «Вектор-Бест».

Основные требования к контрольным препаратам.

1. Интервал показателя оптической плотности должен находиться в линейной области от 0,5 до 1,5 о.е.
2. Рассчитанная концентрация антител в контрольном образце не должна находиться в зоне значений (точек) калибровочных образцов, входящих в

состав набора реагентов, по которым строится калибровочный график от точки к точке.

3. Количество контрольного препарата одной серии (или одной серии разведенного) должно быть достаточным для проведения контроля качества в течение не менее года.

До начала проведения следующих этапов необходимо провести предварительное тестирование подготовленных к работе препаратов «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG» методом ИФА на тест-наборах «ВектоКорь-IgG» и «ВектоРубелла-IgG» производства АО Вектор-Бест (Новосибирск) и убедиться, что препараты удовлетворяют описанным выше требованиям. Поскольку все дальнейшие действия для препаратов «ВЛК Корь-IgG» цельного и «ВЛК Рубелла-IgG», разведенного 1:2, одинаковы, порядок проведения процедур будет описан для обоих контрольных препаратов одновременно, и они будут ниже именоваться ВЛК.

2. Оценка сходимости результатов измерений ВЛК.

Согласно ГОСТ Р 53133.1-4-2008 [18], следует проводить 10 измерений ВЛК в одной аналитической серии на одном планшете. Результаты учитывают двумя способами: качественным ОП (о.е) и количественным (МЕ/мл).

Для расчета среднего значения $X_{ср}$ (1), среднеквадратичного отклонения (2), коэффициента вариации (3) образцов ВЛК, следует использовать формулы:

$$X_{ср} = (\sum X_i)/n \quad (1)$$

$$S = \sqrt{(\sum (X_i - X_{ср})^2)/n-1} \quad (2)$$

$$CV = S/X_{ср} \times 100 \%, \quad (3)$$

Где: X_i - значения измерений ОП (о.е.) или концентрации (МЕ/мл);

$X_{ср}$ – среднее значение ОП (о.е.) или концентрации (МЕ/мл);

S – среднее квадратичное отклонение ОП (о.е.) или концентрация (МЕ/мл);

CV - коэффициент вариации ОП (о.е.) или концентрации (МЕ/мл).

Также эти расчеты можно выполнить на компьютере, используя стандартный пакет программ Microsoft Excel.

На основе полученных 10 значений необходимо рассчитать коэффициент внутрисерийной вариации методики CV_{10} для ВЛК. CV_{10} не должен превышать 8,0 % для качественного (ОП о.е.) и количественного (МЕ/мл) учета. Если вычисленный CV_{10} превышает 8%, следует провести работу по снижению внутрисерийной вариации результатов данного вида анализа, найти причину и ее устранить. Возможные причины: плохая работа дозаторов, ошибки работы оператора, плохая работа автоматического устройства для промывки планшетов. Если внутрисерийная вариация метода отвечает установленным нормам, переходят к следующей стадии.

3. Оценка воспроизводимости результатов измерений препаратов для внутрилабораторного контроля качества и построение контрольных карт.

На второй стадии проводят по 20 измерений ВЛК в 20-ти аналитических сериях в течение 20-ти дней. Для сокращения продолжительности построения контрольной карты возможно проведение измерений два раза в день в течение 10-ти дней. По результатам 20 аналитических серий, согласно ГОСТ Р 53133.1-4-2008 [18], рассчитывают для качественного учета результатов ОП ср., для количественного учета результатов - среднюю концентрацию в МЕ/мл, их S , его контрольные пределы $\pm 1S$, $\pm 2S$, $\pm 3S$ и CV_{20} по формулам, приведенным в предыдущем параграфе. Полученный результат CV_{20} сравнивают с допустимыми значениями $CV_{\text{воспр.}}$, не превышающими 19% для качественного и количественного учета результатов при анализе «ВЛК Корь-IgG» и для «ВЛК Рубелла-IgG». Вычисленные значения CV_{20} в лаборатории должны быть меньше или равны указанному допустимому значению $CV_{\text{воспр.}}$. Если вычисленный в лаборатории CV_{20} для ВЛК превышает допустимое значение, следует провести работу по снижению аналитической вариации метода, после чего провести 20 новых измерений ВЛК и повторить вычисления. Если рассчитанный в лаборатории CV_{20} не

превышает допустимых значений $CV_{воспр.}$, по полученным результатам строят контрольные карты для показателей ОП(о.е.) и концентрации (МЕ/мл) отдельно. В таблице 5.1 приведен пример рассчитанных параметров, необходимых для построения контрольной карты. На рисунке 5.1 представлен пример построенной контрольной карты и проведение оперативного контроля. С использованием построенной контрольной карты осуществляют оперативный (текущий) контроль качества результатов определения исследуемого показателя. С этой целью в каждой аналитической серии в одной лунке ставят ВЛК и измеряют показатель оптической плотности (качественная оценка) или рассчитывают концентрацию ВЛК (количественная оценка результатов). Полученный результат наносят на контрольную карту.

Таблица 5.1 - Пример параметров для построения контрольной карты.

Показатель	ВЛК ₂ *	
	МЕ/мл.	ОП.
X ср ВЛК	0,398	0,298
Ст. откл(S)	0,042	0,053
CV, %	10,55	17,68
X+1S	0,440	0,351
X-1S	0,356	0,245
X+2S	0,482	0,403
X-2S	0,314	0,193
X+3S	0,524	0,456
X-3S	0,272	0,140

Оценку результатов исследования контрольных материалов следует проводить с использованием контрольных правил, получивших название (по имени их автора) "множественных правил Westgard". В любом случае, если полученное значение аналита в ВЛК находится вне пределов $\pm 3S$, необходимо найти ошибки, устранить их и провести анализ заново.

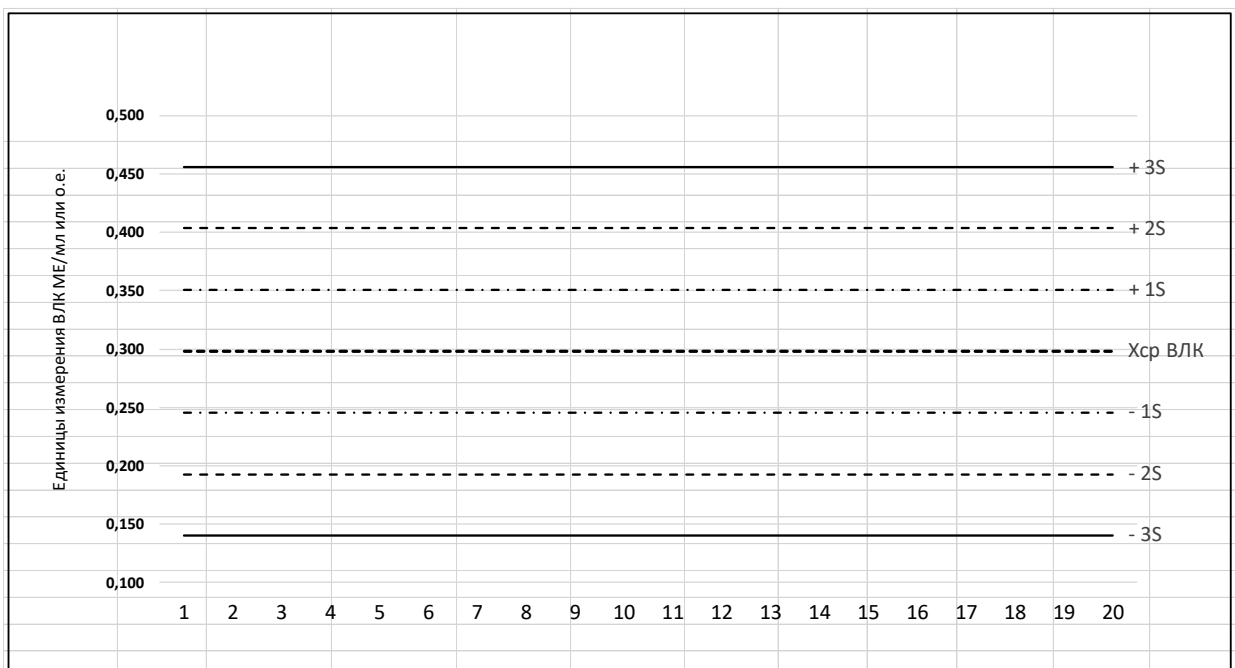


Рисунок 5.1 - Образец контрольной карты

Правила Вестгарда

Правило 1_{2S} : один из результатов ВЛК выходит за пределы $\pm 2S$. Признак случайной ошибки. В этом случае проверяется последовательно наличие всех нижеследующих признаков, и аналитическая серия признается неудовлетворительной, если присутствует хотя бы один из них:

Правило 4_{1S} : четыре последовательных измерения ВЛК превышают $+1S$ или лежат ниже предела $-1S$. Признак систематической ошибки.

Правило 1_{3S} : один из результатов ВЛК выходит за пределы $\pm 3S$. Признак случайной ошибки.

Правило R_{4S} : два последовательных контрольных измерения ВЛК расположены по разные стороны от «коридора» $\pm 2S$. Признак случайной ошибки.

Правило 2_{2S} : два последовательных контрольных измерения ВЛК превышают предел $+2S$ или лежат ниже предела $-2S$. Признак систематической ошибки.

Правило 10_X : десять последовательных измерений ВЛК располагаются по одну сторону от линии, соответствующей X . Признак систематической ошибки.

Контрольные правила должны проверяться в определенной последовательности. Так, если на контрольной карте обнаружено превышение одного из пределов $\bar{X} \pm 2S$ (контрольный признак 1_{2S}), то последовательно проверяют наличие контрольных признаков 1_{3S} , 2_{2S} , R_{4S} , 4_{1S} и 10_X . Если обнаруживают хотя бы один из указанных признаков, все результаты, полученные в данной аналитической серии, считаются неприемлемыми. Проведение анализа приостанавливают, выявляют и устраняют возможные причины возникновения ошибки. При этом важно иметь в виду, что появление контрольных признаков 1_{3S} и R_{4S} свидетельствует об увеличении случайных ошибок, в то время как признаки 2_{2S} , 4_{1S} и 10_X - об увеличении систематической ошибки методики.

После устранения причин появления повышенных погрешностей все пробы, проанализированные в этой серии (и пациентов, и контрольные), исследуют повторно. Поскольку для устранения причин погрешностей в методику были внесены изменения, результаты контрольной серии измерений ВЛК, признанной неприемлемой, и предшествующих ей серий не должны использоваться при повторной оценке и в последующих сериях. Так, например, в повторной серии (первой после внесения изменений в методику) могут быть использованы лишь два контрольных результата этой серии, т.е. правила 4_{1S} и 10_X к этой серии не применимы.

Если результаты измерений ВЛК при проведении оперативного внутрилабораторного контроля качества находятся в соответствии с контрольными правилами, это свидетельствует о правильности проведения исследования IgG-антител к вирусу кори (или краснухи) методом ИФА.

ВЫВОДЫ

1. Уровень серопозитивных к вирусу краснухи среди лиц в возрасте 6-7 лет достигает 90% от числа обследованных в этой возрастной группе (вторая вакцинация от краснухи) и сохраняется на этом уровне до 60 лет и старше, тогда как уровень серопозитивных к вирусу кори достигает максимума в возрастной группе 7-14 лет (81,4%). Выявлено значимое снижение уровня серопозитивных к антигенам вируса кори лиц в возрастной группе 18-30 лет до 57,5%.
2. В условиях спорадической заболеваемости корью и отсутствия естественного бустирования вакцинация против кори серонегативных взрослых формирует высокий уровень специфических антител как у впервые вакцинированных, так и у вакцинированных в детстве, но утративших антитела.
3. Установлено, что первичным типом иммунного ответа на вакцинацию против кори реагируют 44-48 % серонегативных взрослых, что свидетельствует об отсутствии иммунологического подтверждения проведенных в детстве прививок, тогда как 52-56% реагирует на прививку вторичным типом иммунного ответа, следовательно, они были привиты, но со временем утратили противокоревые антитела.
4. Среди взрослых больных корью до 66% реагировали вторичным типом иммунного ответа, что свидетельствует о том, что в условиях отсутствия естественного бустирования привитые в детстве могут заболеть корью во взрослом возрасте в случае утраты противокоревых антител в процессе жизни, сохраняя при этом В-клетки памяти, отвечающие на контакт с диким вирусом вторичным типом иммунного ответа. В то же время, среди больных корью детей и подростков в 100% случаев был выявлен первичный тип иммунного ответа, что свидетельствует о том, что все заболевшие дети не были привиты.
5. Аттестованные на базе референс-лаборатории ЕРБ ВОЗ (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского) образцы «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК

Рубелла-IgG» пригодны для проведения внутрилабораторного контроля качества при исследовании IgG-антител к антигенам вирусов кори и краснухи качественным и количественным способом с помощью тест-систем «ВектоКорь-IgG» и «ВектоРубелла-IgG».

- б. Разработан алгоритм проведения внутрилабораторного контроля качества при определении IgG-антител к вирусам кори и краснухи методом иммуноферментного анализа на примере тест-систем «ВектоКорь-IgG» и «ВектоРубелла-IgG».

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для оценки состояния популяционного иммунитета целесообразно обследовать разные возрастные группы без учета прививочного анамнеза. Выявленная прямая корреляционная зависимость между повышенным уровнем серонегативных к вирусу кори и заболеваемостью корью лиц в возрасте 18-30 лет поднимает вопрос о проведении контроля уровня антител против вируса кори среди школьников 10-11 классов и ревакцинации выявленных серонегативных, который требует дальнейшего рассмотрения
2. Предложен алгоритм проведения процедуры внутрилабораторного контроля качества с помощью препаратов «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG» на тест-системах «ВектоКорь-IgG» «ВектоРубелла-IgG». Показано, что для достижения оптимальных результатов при проведении оперативного контроля качества восстановленный препарат «ВЛК Корь-IgG» следует использовать в цельном виде, а для препарата «ВЛК Рубелла-IgG» наилучшим разведением оказалось 1:2. При создании или выборе препарата ВЛК для работы, необходимо не допускать попадания измеряемых значений оптической плотности ВЛК в зону «точки калибратора». При определении содержания антител к вирусу кори и краснухи и проведения оперативного контроля качества образец ВЛК должен проходить те же стадии разведения, что и исследуемые образцы пациентов.
3. Лабораториям при проведении ВКК с помощью препаратов «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG» рекомендовано ориентироваться на результаты расчетов сходимости и воспроизводимости, представленные в методических рекомендациях МР 4.2.0287-22 «Организация внутреннего контроля качества в лабораториях, проводящих исследования на специфические антитела к вирусу кори методом иммуноферментного анализа», основанных на наших исследованиях, в связи с отсутствием в приказах критериев оценки сходимости и

воспроизводимости. Коэффициент вариации при оценке сходимости результатов для «ВЛК Корь-IgG» и «ВЛК Рубелла-IgG» при качественном и количественном измерении не должен превышать 8%, а коэффициент вариации при оценке воспроизводимости – 19%.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В качестве перспектив проведенного исследования предполагается продолжить изучение формирования и поддержания гуморального иммунитета к вирусам кори и краснухи у лиц разных возрастных групп. Весьма перспективно также исследование клеточного иммунитета к этим вирусам с целью выяснения, предотвращает ли наличие противовирусного клеточного иммунитета у серонегативных заболевание корью и краснухой.

Планируется разработать порядок и объем процедур при использовании панели сывороток, содержащих IgG-антитела к вирусам кори и краснухи и не содержащих таковые антитела, для проведения входящего контроля и сопоставления результатов тестирования сывороток от больных и привитых людей на тест-системах разных производителей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алёшкин, В.А. Научное и методическое обеспечение эпидемиологического надзора за управляемыми детскими капельными инфекциями (корью, краснухой, дифтерией) / А.В. Алешкин // Медицинский альманах. – 2009. – №2. – С. 102-104.
2. Алешкин, В.А. Перспективы элиминации кори в России / В.А. Алешкин, Н.Т. Тихонова, А.Г. Герасимова // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. -2002. - № 6. - С. 8–11
3. Ассоциация специалистов некоммерческое партнерство «Центр внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований» / Электронный ресурс, режим доступа: <http://www.fsvok.ru/programs/immunoserologicheskie-issledovaniya-12/>
4. Асташкина, О.Г. О контроле качества лабораторных исследований судебно-биохимическом отделении бюро судебно-медицинской экспертизы / О.Г. Асташкина, Е.С. Тучик, Е.П. Столярова // Лаборатория ЛПУ. – 2014. - № 4.- С. 8-10.
5. Бичурина, М.А. К вопросу о совершенствовании диагностики краснухи у лиц с экзантемными заболеваниями / М.А. Бичурина, А.Ю. Антипова, Т.Н. Москалева, В.А. Качнов // Материалы международной конференции под ред. А.Б. Жебруна. — СПб.: ФГУН НИИЭМ имени Пастера Роспотребнадзора, 2010. — 49.
6. Бичурина, М.А. Краснуха: эпидемиология, лабораторная диагностика и профилактика в условиях спорадической заболеваемости / М.А. Бичурина, Л.В. Лялина, И.Н. Лаврентьева, Н.В. Железнова, А.Ю. Антипова, Ж.В. Терентьева Аналитический обзор: СПб, 2010 г. -68 с.
7. Бичурина, М.А. Вспышка кори в детской больнице Санкт-Петербурга в 2012 году / М.А. Бичурина, Е.В. Тимофеева, Н.В. Железнова, Н.А. Игнатьева, С.В. Шульга, Л.В. Лялина, О.В. Дегтярев // Журнал инфектологии. - 2013. - Т5. – № 2. – С.96-102.

8. Бобкова, М.Р. Применение контрольных образцов для внутрилабораторного контроля качества скринингового ИФА на наличие антител к ВИЧ. Методические рекомендации /М.Р.Бобкова, Е.В.Буравцова, Т.В. Калашникова, В.В.Покровский, З.К. Суворова // Москва. - 2004.-15 с.
9. Всемирная организация здравоохранения. Седьмое совещание Европейской региональной комиссии по верификации элиминации кори и краснухи (РКВ)13–15 июня 2018 г.Париж, Франция. – 50 с. режим доступа: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/measles-and-rubella/publications/2018/7th-meeting-of-the-european-regional-verification-commission-for-measles-and-rubella-elimination-rvc.-report>.
- 10.Галина, Н.П. Анализ организации прививок детского и взрослого населения РФ против дифтерии, столбняка, кори и вирусного гепатита В / Н.П. Галина, А.Я. Миндлина, Р.В. Полибин // Инфекция и иммунитет. – 2019. -т. 9. - № 5–6. -С. 779–786
- 11.Голева, О.В. Особенности противокоревоего иммунитета у населения Санкт-Петербурга / О.В. Голева, И.Г. Самойлова, Е.А. Мурина, А.А. Мундруева// Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2012. - № 6. - С.25-29.
- 12.Готвянская, Т.П.Состояние популяционного иммунитета в отношении инфекций, управляемых средствами специфической профилактики у медицинских работников (по материалам банка сывороток крови) / Т.П. Готвянская, А.В. Ноздрачева, Е.В. Русакова, Л.Ф. Евсеева, О.Г. Николаева, В.О. Полонский, Т.А. Семененко // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2016. - №3. - С.8-16.
- 13.Голубкова, А.А.Корь. Эпидемиологический процесс и направления контроля online / А.А.Голубкова, Т.А.Платонова, А.Г.Сергеев, Е.В.Леленкова, Т.С.Южанина // Москва: Материалы XI съезда ВНПОЭМП16–17 ноября 2017 года. – 587 с.
- 14.ГОСТ Р 50779.42-00 Статистические методы. Контрольные карты Шухарта / Москва: Стандартинформ, 2004. – 32 с.

- 15.ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро / Москва: Стандартиформ, 2014. – 23 с.
- 16.ГОСТ Р ИСО 15189—2015 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности / Москва: Стандартиформ, 2015. – 34 с.
- 17.ГОСТ Р 51609-2000 Изделие медицинское. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования / Москва: Госстандарт России, 2000. – 12 с.
- 18.ГОСТ Р 53133.2-2008 Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований / Москва: Стандартиформ, 2009. – 20 с.
- 19.ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований / Москва: Стандартиформ, 2009. – 17 с.
- 20.ГОСТ Р 53133.4-2008. Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила проведения клинического аудита эффективности лабораторного обеспечения деятельности медицинских организаций / Москва: Стандартиформ, 2009. – 8 с.
- 21.Долгов, В.В. Фотометрия в лабораторной практике / В.В.Долгов, Е.Н.Ованесов, К.А. Щетникович. –Москва: Кафедра КДЛ, 2004. – 142 с.
- 22.Долгов, В.В.Иммуноферментный анализ в клинико-диагностических лабораториях / В.В. Долгов, Н.Г.Ракова, В.Е.Колупаев, Н.С.Рытикова //М.-Тверь, «Триада», 2007. - 320 с.
- 23.Дружникова, Е.П. Этапы эволюции систем управления качеством технических объектов: зарубежный и отечественный опыт / Е. П. Дружникова, Г. И. Ткаченко // Актуальные проблемы экономики в условиях реформирования современного общества: материалы IV междунар. науч.-практ. конф., посвященной 140-летию со дня основания НИУ БелГУ, Белгород, 25 нояб. 2015 г. / НИУ БелГУ ; под науч. ред. Е.В. Никулиной. - Белгород, 2016. - С. 175-179.

24. Ерш, А.В. Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям / А.В. Ерш, А.Г. Полтавченко, С.А. Пьянков, А.П. Агафонов, Н.А. Кривенчук, Д.В. Буторин // Вопросы вирусологии. – 2015. - № 60 (1). – С. 41-45.
25. Зарганьянц, А.И. Длительность и напряженность поствакцинального гуморального иммунитета к вирусам кори, паротита и краснухи / А.И. Зарганьянц, И.В. Яковлева, Т.С. Селезнева, В.В. Свиридова, А.А. Белявская // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2005. - № 5(24). - С. 15-19
26. Каира, А.Н. Вспышка кори в мытищинском районе Московской области / А.Н. Каира, А.В. Волосникова, Т.В. Соломай // Санитарный врач. - 2014. - № 2. – С.34-36,
27. Каллнер, А. Стандарты и рекомендации для клинической лаборатории / А. Каллнер // Клиническая лабораторная диагностика. - 2010. - № 2. – С. 47—54.
28. Ковязина, С.А. Анализ заболеваемости корью среди привитых и непривитых лиц в свердловской области во время вспышки 2016 г. / С.А. Ковязина, С.В. Кузьмин, А.И. Юровских, С.В. Скрябина, Ю.Ю. Умнова // Материалы XI съезда ВНПОЭМП, Москва, 16–17 ноября 2017 года. - 592 с.
29. Костинов, М.П. Уровень коллективного иммунитета к вирусу кори у сотрудников отдельной больницы в рамках Государственной программы элиминации кори. / М.П. Костинов, Н.Н. Филатов, П.И. Журавлев, Л.С. Гладкова, В.Б. Полищук, А.Д. Шмитько, Д.В. Пахомов, Е.А. Хромова, Г.В. Васильева, И.А. Тихонова, А.А. Рыжов, Д.А. Благовидов, А.М. Костинова. // Инфекция и иммунитет. - 2020. – Т.10. - №1. - С.129-136.
30. Краснова, Е.М. Иммунопрофилактика как эффективный способ борьбы с корью / Е.М. Краснова, Г.С. Санжапова // Материалы XI съезда ВНПОЭМП, Москва, 16–17 ноября 2017 года. - 592 с.

- 31.Краснуха / Информационный бюллетень ВОЗ №366 // Ноябрь – 2014. – 4 с. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs367/ru/>.
- 32.Кудрявцева, Е.Н.Опыт применения региональной программы внешней оценки качества серологических исследований на наличие анти-ВИЧ в сети скрининговых лабораторий Московской области / Е.Н. Кудрявцева, О.А. Лобанова, М.С. Воробьева, С.Н. Кузин //Альманах клинической медицины. - 2008. - №18. – С. 3-9.
- 33.Лаврентьева, И.Н. Штамм «Орлов-Д» для получения живой аттенуированной вакцины против краснухи/ И.Н. Лаврентьева//Автореф. диссер. д.м.н. Москва, 2009. – 240 с.
- 34.Лаврентьева, И.Н.Вирус краснухи Национальное руководство Клиническая лабораторная диагностика /И.Н. Лаврентьева, А.Ю. Антипова //Москва.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – т.2.- С.663-665.
- 35.Лаврентьева, И.Н. Разработка отечественной живой аттенуированной вакцины против краснухи на основе штамма «Орлов» (экспериментальные исследования/ И.Н. Лаврентьева, А.Б. Жебрун// Журнал Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2010. - № 3. - С. 72 – 75.
- 36.Малахов, В.Н. Нерешенные проблемы обеспечения качества клинической лабораторной диагностики / В.Н.Малахов //Клиническая лабораторная диагностика. - 2014. - № 9. - С.4.
- 37.Мамаева, Т.А.Алгоритм лабораторного подтверждения и дифференциальной диагностики коревой инфекции в период элиминации кори в Российской Федерации/ Т.А. Мамаева, Н.В.Железнова, М.А. Наумова, М.В.Говорухина, Н.А. Калашникова, М.А. Бичурина, С.Л.Мукомолов // Инфекция и иммунитет. - 2015. -т.5. - №1. - С.55-62.
- 38.Мамаева, Т.А. Совершенствование контроля качества исследований методом ИФА при лабораторном подтверждении кори и краснухи на этапе элиминации этих инфекций /Т.А. Мамаева, Н.В. Железнова, М.А. Наумова, Т.С. Чехляева, Е.В. Воробейчиков, М. В. Матю, В.А. Алешкин // Инфекция и иммунитет. – 2017. - т. 7. - № 1. - с. 69–78.

39. Мамаева, Т.А. Особенности лабораторной диагностики кори у больных с разным прививочным анамнезом / Т.А. Мамаева, Г.Ю. Липская, М.А. Наумова, С.В. Шульга, М. Mulders, D.A. Featherstone, Л.А. Завьялова, Е.В. Чернышева, Е.П. Замятина, Н.Н. Кузнецова // Вопросы вирусологии. - 2012. - №5. – т. 57. - С.21-26.
40. Мамаева, Т.А. Оценка коммерческих тест-систем ИФА разного формата для определения уровня специфических IgM и IgG в сыворотках больных корью / Мамаева Т.А., Наумова М.А., Железнова Н.В., Липская Г.Ю., Mulders S.M., Featherstone D.A. // Вопросы вирусологии. - 2013.-т. 58. - №5. - С. 43–48.
41. Мамаева, Т.А. Национальная лабораторная сеть Российской Федерации по диагностике кори и ее роль в выполнении программы ВОЗ по ликвидации кори / Т.А. Мамаева, Н.Т. Тихонова, М.А. Наумова, С.В. Шульга // Здоровье населения и среда обитания. - 2007. - №11(176). - С. 4 – 7.
42. Мардалы, С.Г. Краснуха / С.Г. Мардалы Г.И. Кирпичникова, В.А. Неверов Г. // Электрогорск. – 2009. - С.31
43. Методические рекомендации МР 3.1.2.0135-18. 3.1.2 «Эпидемиология. Профилактика инфекционных заболеваний. Инфекции дыхательных путей. Генетический мониторинг циркуляции вирусов кори и краснухи» / Москва, 2019.
44. Методические указания МУ 3.1.2.2356-08 «Эпидемиологический надзор за врожденной краснухой» / – М., 2008. – С. 5–14.
45. Методические указания МУ 3.1.2943-11 «Организация и проведение серологического мониторинга и состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В)» / Москва, 2011. – 20 с.
46. Мошкин, А.В. Алгоритм определения требований к аналитическому качеству с использованием методологии «Шесть сигм» / А.В. Мошкин,

- М.М.Федорова, И.А.Арефьева //Клиническая лабораторная диагностика. - 2014.- № 9. -100 с.
- 47.Национальная программа элиминации кори и краснухи в Российской Федерации (2016-2020). Утв. Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и Министром здравоохранения Российской Федерации // Москва, - 2021.
- 48.Нетесова, И.Г. Проведение внутрилабораторного контроля качества неколичественных методов иммуноферментного анализа /И.Г. Нетесова, М.Р. Бобкова // Справочник заведующего КДЛ. – 2011. -№6. -С. 9-15.
- 49.Нетесова, И.Г.Некоторые результаты пилотного проекта «Организация внутрилабораторного контроля качества неколичественных методов иммуноферментного анализа» в 36 лабораториях 4-х регионов России / И.Г. Нетесова, Л.А. Мостович, О.А. Ярославцева // Новости «Вектор-Бест». – 2017. - № 3 (85). - С.6-11.
- 50.Нетесова, И.Г.Организация внутрилабораторного контроля качества неколичественных методов иммуноферментного анализа с помощью оценки аналитической надежности лабораторных исследований /И.Г.Нетесова, Л.А.Мостович, О.А. Ярославцева// Лаборатория ЛПУ. - 2018.- № 12.- С.1-4.
- 51.Нетесова, И.Г.Проведение внутрилабораторного контроля качества неколичественных методов иммуноферментного анализа при наличии и отсутствии контрольных материалов / И.Г. Нетесова, О.А. Ярославцева //Справочник заведующего КДЛ. – 2015. -№7. -С. 29-36.
- 52.Николаев, Н.С., Назарова В.В., Добровольская Н.Ю., Орлова А.В., Пчелова Н.Н. Управление качеством в клинико-диагностической лаборатории в условиях ФГБУ «Федеральный центр ревматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава России / Николаев, Н.С., Назарова В.В., Добровольская Н.Ю., Орлова А.В., Пчелова Н.Н. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. - № 10. -С. 59-63.

53. Нисевич, Л.Л. Современные проблемы врожденной краснухи (обзор) / Л.Л. Нисевич // Детский доктор. – 2000. - №5 – С. 26-30.
54. Нисевич, Л.Л. Краснуха / Л.Л.Нисевич// Детские инфекции. - 2003.- №2.- С. 54-60.
55. Ноздрачева, А.В. Оценка напряженности гуморального иммунитета к кори и краснухе у беременных женщин в Москве / А.В.Ноздрачева, Т.А. Семенов, С.Г.Марданлы, С.В. Ротанов //Журн. микробиол. – 2017. - № 3. - С. 91—98.
56. Ноздрачева, А.В. Распространенность антител к вирусам кори, краснухи и эпидемическому паротиту у военнослужащих /А.В. Ноздрачева, В.В.Рыбин, А.А.Грицик, В.А.Заволожин, С.Н.Кузин, Т.А. Семенов //Военно-медицинский журнал. - 2018. - т. 339. - №1.- С. 66-70.
57. Носик, Н.Н. Лабораторная диагностика вирусных инфекций / Н.Н. Носик, В.М. Стаханова // Клин. микробиология антимикроб. химиотер. — 2000. - № 2. - Т. 2. - С. 70—78.
58. Олейник, О.В. Наборы реагентов ЗАО «Вектор-Бест» для диагностики коревой инфекции / О.В. Олейник, В.В. Распопин, М.П. Гришаев // Информационный бюллетень. - №1(55). - 2010.- С.7-10
59. Онищенко, Г.Г. Актуальные вопросы организации вакцинопрофилактики в Российской Федерации / Г.Г. Онищенко, Е.Б.Ежлова, А.А.Мельникова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. - №5. – С. 110–4.
60. ОСТ 42-503-95 «Контрольно-аналитические и микробиологические лаборатории отделов технического контроля промышленных предприятий, производящих лекарственные средства. Требования и порядок аккредитации» (утв. Минздравмедпромом РФ от 6 октября 1995 г. / Москва, 1995 г.
61. Остроумова, М.Н. Опыт управления качеством лабораторных исследований в клинко-диагностической лаборатории Городского консультативно-

- диагностического центра № 1 г. Санкт-Петербург. / М. Н. Остроумова, М. М. Мнускина. // Медицинский алфавит. - 2015. – т.3. - № 11. - С.12-16.
62. Перспективы развития производства и применения иммунобиологических препаратов в XXI веке / Материалы конференции. – Пермь, 2018. – 336 с.
63. Пименов, Л.М. Подходы к разработке стандартизированных технологий клинических лабораторных исследований / Л.М. Пименов, В.В. Меньшиков // Проблемы стандартизации в здравоохранении. – 2012. - №5-6. С. 3-8.
64. Письмо Роспотребнадзора Минздравсоцразвития Российской Федерации № 01/1712-8-32 от 3 марта 2008 г.
65. Письмо Роспотребнадзора от 30.07.2019 № 02/10901–2019–32 «Об эпидемиологической ситуации по кори и краснухе в 2018 году».
66. Попова, А.Ю. Изучение уровня иммунитета к вирусу кори в отдельных группах населения Гвинейской Республики в рамках глобальной программы элиминации кори/ А.Ю. Попова, М.А. Бичурина, И.Н. Лаврентьева, Н.В. Железнова, А.Ю. Антипова, С.А. Щербакова, М.Й. Буаро, А.А. Тотолян // Инфекция и иммунитет. 2016. - т. 6. - № 4. - С. 353–358.
67. Попова, А.Ю. Изучение уровня иммунитета к вирусу кори в отдельных группах населения гвинейской республики в рамках глобальной программы элиминации кори. Сообщение 2 / А.Ю. Попова, М.А. Бичурина, И.Н. Лаврентьева, Н.В. Железнова, А.Ю. Антипова, С.А. Щербакова, М.Й. Буаро, Арег А. Тотолян // Инфекция и иммунитет. 2017. -т. 7.- № 1.-С. 79–84.
68. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 17 апреля 2013 г. N 17 г. Москва "Об утверждении Программы "Профилактика кори и краснухи в период верификации их элиминации в Российской Федерации (2013 - 2015 гг.)" и плана ее реализации". 27 сентября 2013 г. / Российская газета - Федеральный выпуск. - № 217(6193)

69. Постановление Правительства Российской Федерации № 323 от 30 июня 2004 г. «Об утверждении Положения о Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социального развития».
70. Постовит, В.А. Детские капельные инфекции у взрослых / В. А. Постовит—СПб.: Теза, 1997.—С. 90-156.
71. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 3 декабря 2007 г. № 736 «Об утверждении перечня медицинских показаний для искусственного прерывания беременности» с изменениями и дополнениями от 27 декабря 2011 г.
72. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Минздравсоцразвития Российской Федерации № 1711-Пр/06 от 28 июля 2006 г. «О порядке государственной регистрации наборов реагентов для диагностики *in vitro* и сред питательных микробиологических».
73. Приказ Министра здравоохранения СССР от 25 апреля 1973 г. № 322 "О сроках проведения профилактических прививок".
74. Приказ от 14 января 1980 г. № 50 О календаре профилактических прививок и их организации и проведении.
75. Приказ МЗ СССР от 23.04.85 № 545 "О дальнейшем совершенствовании контроля качества клинических лабораторных исследований".
76. Приказ № 9 от 26.01.94 "О совершенствовании работы по внешнему контролю качества клинических лабораторных исследований"
77. Приказ № 117 от 03.05.95 "Об участии клиничко-диагностических лабораторий ЛПУ России в Федеральной системе внешней оценки качества клинических лабораторных исследований".
78. Приказ № 60 от 19.02.96 г. "О мерах по дальнейшему совершенствованию Федеральной системы внешней оценки качества клинических лабораторных исследований".
79. Приказ Минздрава России от 18.12.97 N 375. О календаре профилактических прививок.

80. Приказ Минздрава Российской Федерации № 129 от 15 апреля 1999 г. «О совершенствовании системы экспертизы и испытаний медицинских иммунобиологических препаратов».
81. Приказ Минздрава России от 07.02.2000 № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации» / Электронный доступ: <http://docs.cntd.ru/document/901755005>.
82. Приказ Минздрава Российской Федерации № 156 от 10 мая 2000 г. «О разрешении на применение в медицинских целях изделий медицинского назначения и медицинской техники отечественного и зарубежного производства в Российской Федерации».
83. Приказ от 27 июня 2001 г. N 229 О национальном календаре профилактических прививок и календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям.
84. Приказ Минздрава Российской Федерации № 292 от 30 июля 2001
85. Приказ от 21.03.2003 N 117 "О реализации "Программы ликвидации кори в Российской Федерации к 2010 году".
86. Приказ от 26 мая 2003 г. №220. Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов». Электронный адрес: <http://docs.cntd.ru/document/901868423>
87. Приказ Минздрава Российской Федерации № 735 от 30 октября 2006 г. «Об утверждении Административного регламента Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции регистрации изделий медицинского назначения».
88. Приказ Минздрава России от 21.03.2014 N 125н (ред. от 24.04.2019) "Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим

- показаниям"(Зарегистрировано в Минюсте России 25.04.2014 N 32115). С. 15.
- 89.Распоряжение Правительства РФ от 4 апреля 2014 г. N 523р. О выделении в 2014-2015 годах Роспотребнадзору бюджетных ассигнований из Федерального бюджета в рамках участия Российской Федерации в инициативе Всемирной Организации Здравоохранения по элиминации кори и краснухи.
- 90.Ротанов, С.В. Разработка и опыт проведения внешнего контроля качества серологических исследований для диагностики сифилиса в дерматовенерологических учреждениях Российской Федерации / С.В. Ротоанов // Вестник дерматовенерологии и венерологии. - 2007.- №3.- С.22-26.
- 91.Ротанов, С.В. Стандартизация условий деятельности серологических лабораторий – путь к оптимизации лабораторной диагностики сифилиса / С.В. Ротанов, Н.В.Фриго //Вестник дерматовенерологии и венерологии. - 2007.- № 6.- С.28-33.
- 92.Ротанов, С.В. Разработка стандартных операционных процедур исследований, применяемых при диагностике сифилитической инфекции / С.В. Ротоанов, Н.В. Фриго, И.Н. Лесная// Проблемы стандартизации в здравоохранении. - 2008.- №10. - С. 6-10.
- 93.Руководство по лабораторной диагностике кори и краснухи. Вторая редакция. — 2005. — 115 с. — Режим доступа:
http://www.who.int/immunization_monitoring/LabManualFinalRussianV.pdf
- 94.Русаков, В.Н.Влияние иммунизации против кори на многолетнюю динамику заболеваемости корью на территории западного административного округа города Москвы /В.Н.Русаков, М.В. Монастырский, А.М. Левшунов // Материалы XI съезда ВНПОЭМП, Москва, 16–17 ноября.
- 95.Рыжова, С.В. Контроль качества определения уровня тиреоидных гормонов на полуавтоматических иммуноферментных анализаторах

- /С.В.Рыжова, Т.С.Белохвостиков, А.Н. Загородняя, А.В. Кочкин // Сибирский медицинский журнал. – 2012. - № 6. -С. 110-112.
- 96.Самойлович, Е.О. Надзор за корью в Республике Беларусь: подготовка к верификации элиминации инфекции / Е.О. Самойлович // Медицинский журнал. Минск. - 2014. - №2. - С.94-99.
- 97.Сармометов, Е.В.Оценка напряженности противокорревого иммунитета у медицинских работников г.Перми / Е.В. Сармометов, Н.М.Мокова, Н.Б. Вольдшмидт, В.И.Сергевнин, О.В. Цвиркун, Н.А.Метелкина // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. -2011. - №4. - С.45-48.
- 98.Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.2952-11 11 «Профилактика кори, краснухи и эпидемического паротита». – М., 2011. – С. 5–8.
- 99.Сайт компании ЗАО «Аналитика» - Режим доступа: <https://www.analytica.ru/>
100. Сайт компании АО «Вектор-Бест» - Режим доступа: <https://www.vector-best.ru/>
101. Сайт компании НПО ООО «Диагностические системы» - Режим доступа: <https://npods.ru/>
102. Сайт компании ЗАО «Эколаб» - Режим доступа: <http://ecolab-d.ru/>
103. Семенова, В.М. Краснушечная инфекция / В.М. Семенова, А.А. Астахов, Т.М. Дмираченко // М: Медицина, - 1994 – С.140
104. Тихонова, Н.Т. Заболеваемость корью и краснухой в России в 2012 году (по региональным центрам) / Н.Т. Тихонова // Москва: Информационный бюллетень № 18. – 2013. – 34 с. Режим доступа: http://www.gabrich.ru/files/center/18_2012.pdf
105. Тихонова, Н.Т. Заболеваемость корью и краснухой в России за 2015 год (по региональным центрам) / Н.Т. Тихонова // Москва: Информационный бюллетень № 25. – Москва. -2016. – 34 с. Режим доступа: http://www.gabrich.ru/files/center/zabol_kr_2015.pdf
106. Тихонова, Н.Т. Заболеваемость корью и краснухой в России за 2019 год / Н.Т. Тихонова // Информационный бюллетень № 32. Москва. 2020. – 35с. Режим доступа: <http://www.gabrich.ru/files/pdf/inf-2019.pdf>

107. Тихонова, Н.Т. Программа элиминации кори в Российской Федерации / Н.Т. Тихонова, А.Г. Герасимова, Т.А.Мамаева // Вакцинация. – 2002. - №5 (23). – С. 6-7.
108. Тихонова,Н.Т. Совершенствование системы эпиднадзора за корью на этапе ее элиминации /Н.Т. Тихонова, А.Г. Герасимова, О.О.Чава, Т.А. Мамаева // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. - 2003.- № 2. - С. 5 – 7
109. Тихонова, Н.Т. Причина роста заболеваемости корью в России в период элиминации инфекции / Н.Т. Тихонова, А.Г. Герасимова, О.В. Цвиркун, Е.Б.Ежлова, С.В. Шульга, Т.А. Мамаева, Н.В. Тураева // Педиатрия. Журнал им. Г.Н.Сперанского. 2013. – Т. 92. № 1. – С 9-14
110. Тихонова, Н.Т. Перспективы реализации Программы ликвидации кори в России / Н.Т.Тихонова, Г.Ф.Лазикова, А.Г. Герасимова, О.В. Цвиркун, О.О. Чава, Т.А. Мамаева // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2005. - №1 (20). – С. 19–22.
111. Тихонова, Н.Т. Лабораторное обеспечение Программы ликвидации эндемичной кори в Российской Федерации / Н.Т. Тихонова, Т.А. Мамаева, С.В. Шульга, Е.Б.Ежлова, И.Н. Лыткина, О.В. Цвиркун, А.Г. Герасимова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2011.- №1 (56). - С. 36 - 39.
112. Тихонова, Н.Т. Корь в России: проблемы ликвидации / Н.Т. Тихонова, А.Г. Герасимова, О.В. Цвиркун, С.В. Шульга, Е.Б.Ежлова, А.А. Мельникова, Г.Г. Онищенко, А.Ю. Попова, В.А. Алешкин; под ред.Г.Г. Онищенко, В.А. Алешкина. - Москва. 2017. Династия. С.552.
113. Топтыгина, А. П. Отчего вакцинация не приводит к элиминации кори? / А.П.Топтыгина, Т. А. Мамаева, В.А. Алешкин // Российский иммунологический журнал. – 2014. – т. 8 (17). - №3. -С. 880-883.
114. Топтыгина, А.П. Прогнозирование специфического гуморального иммунного ответа на основании исходных параметров иммунного статуса детей, привитых против кори, краснухи и эпидемического паротита / А.П. Топтыгина, В.В. Азиатцева, И.А. Савкин, А.А. Кислицин, Е.Л. Семикина,

- Д.С. Гребенников, В.А. Алешкин, А.В. Сулимов, В.Б. Сулимов, Г.А. Бочаров // Иммунология. – 2015. – т. 36 № 1. - С. 22-30.
115. Топтыгина, А.П. Созревание специфического гуморального ответа у детей, привитых вакциной «Приорикс» /А.П. Топтыгина, В.А. Алешкин //Иммунология. - 2008. - т. 29, № 6. -С.350-353.
116. Топтыгина, А.П. Сопоставление первичного и вторичного гуморального иммунного ответа на вакцинацию «Приорикс» / А.П. Топтыгина, В.А. Алешкин // Инфекция и иммунитет. – 2013. – т. 3. - № 4. -С. 359-364.
117. Топтыгина, А.П. Особенности специфического гуморального иммунного ответа против вируса кори /А.П. Топтыгина, Т. А. Мамаева, В.А. Алешкин // Инфекция и иммунитет. – 2013. - т.3. - №3. -С.243-250
118. Топтыгина, А.П. Общие закономерности формирования и поддержания специфического гуморального иммунного ответа на примере ответа на вирусы кори и краснухи/ А.П. Топтыгина //Инфекция и иммунитет. - 2014. - т. 4. - № 1. - С. 7-14.
119. Топтыгина, А.П. Динамика синтеза и циркуляции субклассов специфических IgG при иммунном ответе на вакцину против кори, краснухи, эпидемического паротита / А.П Топтыгина, Т.А. Мамаева // Российский иммунологический журнал. - 2019.- т.13(22). - №1. - С. 78-85.
120. Топтыгина, А.П. Спектр субклассов противокоревых иммуноглобулинов G у лиц, перенесших корь / А.П. Топтыгина, А.Л. Пухальский, Т.А. Мамаева, В.А. Алешкин //Бюлл. exper. биол. - 2004. - т. 137. - № 3. - С. 293-295.
121. Топтыгина, А.П. Возрастные особенности формирования гуморального звена иммунного ответа у детей /А.П. Топтыгина, Е.Л. Семикина, Е.А. Копыльцова, В.А. Алешкин // Медицинская Иммунология. - 2012. - т. 14. - № 4-5. - С. 289-294.
122. Топтыгина, А.П. Формирование и поддержание специфического клеточного ответа на вакцинацию «Приорикс» / А.П. Топтыгина,

- Е.Л.Семикина, В.А. Алешкин // Иммунология. - 2013. - т. 34. -№ 5. - С. 257-261.
123. Тучик, Е.С. О контроле качества в судебно-биохимических отделениях. / Е.С. Тучик, О.Г. Асташкина//Судебно- медицинская экспертиза. – 2013. -№ 5. – С.43-45.
124. Учайкин, В.Ф. Случится ли эпидемия кори в России? В.Ф.Учайкин, О.В. Молочкова // Детские инфекции. - 2012. - №2. - С. 3-4.
125. Учайкин, В.Ф. Краснуха: протокол лечения и программа профилактики / В.Ф. Учайкин, Л.Д. Слунченко, О.В. Шамшева // Краснуха. Синдром врожденной краснухи: информационный сборник. – 2-е изд., доп. – М.-СПб.: 1998. – С. 28–32.
126. Фельдблюм, И.В. Эпидемиологический надзор за вакцинопрофилактикой / И.В. Фельдблюм// Эпидемиология. – 2014. - №3 (13). - С.37-55 .
127. Харсеева,О.И. Напряженность иммунитета к вирусу кори у населения г. Ростова-на-Дону / О.И.Харсеева, Г.Г. Леонова// Журнал фундаментальной медицины и биологии. - 2013. - №1. - С.41-43.
128. Цвиркун, О.В. Эпидемический процесс кори в различные периоды вакцинопрофилактики / О.В. Цвиркун // Диссертация. - Москва, 2014. – 249с.
129. Цвиркун, О.В. Математическое обоснование возможности элиминации кори в России / О.В Цвиркун, В.В. Дедков // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2009. - № 30-1 (44). - С. 30-35.
130. Цвиркун, О.В. Влияние специфической профилактики против кори на уровень и структуру годовой заболеваемости в Российской Федерации / О.В. Цвиркун, И.Н. Лыткина, Е.Б.Ежлова, Н.Т. Тихонова, А.Г.Герасимова, Н.В.Тураева// Инфекционные болезни. - 2011. - №9 (1). - С. 7-23.
131. Цвиркун, О.В. Структура заболевших корью в период элиминации / О.В. Цвиркун, А.Г. Герасимова, Н.Т. Тихонова, Н.В. Тураева, А.С. Пименова //Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2012. - №2(63).- С. 21-25.

132. Цвиркун, О.В. Эпидемический процесс кори в разные периоды ее вакцинопрофилактики / О.В.Цвиркун, Н.Т. Тихонова, Г.В. Ющенко, А.Г. Герасимова // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2015. -№14(2). – С.80–7.
133. Чебалина, Е.А. Краснуха у беременных: риск, диагностика, тактика ведения / Е.А.Чебалина, Е.Э.Баун, С.А, Пшеничная, Е.А. Слюсарь, М.А. Аксенова, Касьяненко, Я.В. Донецкий // Клиническая инфектология и паразитология. - 2014. - № 1 (08). - С.123-129.
134. Чебалина, Е.А. Корь у беременных: риск, диагностика, тактика ведения. (Помощь практическому врачу) / Е.А. Чебалина, В.Н. Жидких, А.И. Салоникиди, В.А. Гридасов // Университетская Клиника. – 2017. -т. 2. - №3 (24). -С. 177-183.
135. Чехляева, Т.С. Генетическое разнообразие вируса краснухи на современном этапе реализации программы элиминации краснухи и предупреждения врожденной краснухи /Т.СЧехляева, С.В. Шульга, Д.В. Ерохов, Н.Т. Тихонова, В.В. Зверев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. - № 5. - С.95-102.
136. Чумакова, В.Н. Корь – управляемая инфекция / В.Н. Чумакова // Материалы XI съезда ВНПОЭМП, Москва, 16–17 ноября 2017 года. - С. 284.
137. Шульга, С.В. Молекулярно – биологический мониторинг циркуляции диких штаммов вируса кори в Российской Федерации, 2003-2005 гг. /С.В. Шульга, М.А. Наумова, Т.А. Мамаева, А.Г. Герасимова, О.В. Цвиркун, Н.Т. Тихонова// Теоретические и практические аспекты элиминации кори: сборник научных трудов ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Москва. – 2005. – С. 148-151.
138. Шульга, С.В. Генетическая характеристика диких штаммов вируса кори изолированных в Российской Федерации в 2003-2005 гг. / С.В. Шульга, М.А. Наумова, Т.А. Мамаева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2006. - № 5. – С. 25-31.

139. Шульга, С.В. Генотипы вируса кори, циркулирующие в Российской Федерации в период реализации программы элиминации кори, 2003-2007 гг. / С.В. Шульга, М.А. Наумова, Т.А. Мамаева, А.Г. Герасимова, О.В. Цвиркун, Н.Т. Тихонова // Материалы международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика инфекционных болезней» – Минск. – 17-18 мая 2007. – С. 24-25.
140. Шульга, С.В. Изменение спектра циркулирующих генотипов вируса как показатель элиминации индигенной кори в России / С.В Шульга, Н.Т. Тихонова, М.А. Наумова, Т.А. Мамаева, А.Г. Герасимова, О.В. Цвиркун // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.- 2009. - №4(47) .- С.4 -8.
141. Элиминация кори и краснухи и предупреждение врожденной краснушной инфекции. Стратегический план Европейского региона ВОЗ. 2005-2010 гг. – Женева, 2005. - С.6-31.
142. Юминова, Н.В. Вакцинопрофилактика кори, эпидемического паротита и краснухи: задачи, проблемы и реалии / Е.О.Контарова, Н.В. Балаев, С.В. Артюшенко, Н.А.Контаров, Н.В. Россошанская, Е.С. Сидоренко, Р.Р.Гафаров В.В. Зверев // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. - 2011. - № 4 (59). - С. 40 – 44.
143. Юнасова, Т. Н. Анализ заболеваемости корью в России и проблемы профилактики кори на этапе элиминации / Т. Н. Юнасова, Д. В. Горенков, А. В.Рукавишников, А. А. Мовсесянц, В. А. Меркулов // Профилактика, диагностика, лечение. – 2019.т. 19. - № 3. - С. 154-160.
144. Янцев, А.В. Выбор статистических критериев /А.В. Янцев. - Симферополь: Фолиант, 2012. – 138 с.
145. Ярилин, А.А. Иммунология /А.А. Ярилин. - М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. - 752 с.
146. Abdulkadir, A. Risk Factors for Rubella Transmission in Kuyu District, Ethiopia, 2018: A Case-Control Study / A. Abdulkadir, T.T. Gebrehiwot. //Interdiscip.Perspect. InfectDis. – 2019. -Sep 16. - P1-8.

147. Augusto, G.F. Report of simultaneous measles outbreaks in two different health regions in Portugal, February to May 2017: lessons learnt and upcoming challenges / G. F. Augusto, A. Silva, N. Pereira, T. Fernandes, A. Leça, P. Valente, E. Calé, B. A. Aguiar, A. Martins, P. Palminha, E. Vinagre, R. Cordeiro, S. Lopo, P. J. Nogueira // *Euro Surveill.* – 2019. – T. 24(3). – P. 1800026.
148. Anis, E. Measles in a highly vaccinated society : the 2007-08 outbreak in Israel / E. Anis, I. Grotto, L. Moerman, B. Warshavsky, P. E. Slater, B. Lev, A. Israeli // *J Infect.* – 2009. – V. 59. – P. 252-258.
149. Azami, M. Rubella Immunity in Pregnant Iranian Women: A Systematic Review and Meta-Analysis / M. Azami, Z. Jaafari, A. Soleymani, G. H. Badfar, S. H. Abbasalizadeh. // *Int J Fertil Steril.* – 2019. – Vol. 13(3). – P. 169-177.
150. Bang, V. N. Surveillance of congenital rubella syndrome (CRS) in tertiary care hospitals in Hanoi, Vietnam during a rubella epidemic / Van Bang, N.; Van Anh, N. T.; Van, V. T.; Thai, T. T.; Van Thuong, N.; Khandaker, G.; Elliott, E. // *Vaccine.* - 2014. – Vol. 32(52). – P. 7065–7069.
151. Barraza, L. Legal and Policy Responses to Vaccine-Preventable Disease Outbreaks / L. Barraza, D. Reiss, P. Freeman // *J. Law Med Ethics.* – 2019. – Vol. 47(2). – P. 11-14.
152. Bätzing-Feigenbaum, J. Spotlight on measles 2010: preliminary report of an ongoing measles outbreak in a subpopulation with low vaccination coverage in Berlin, Germany, January-March 2010 / J. Bätzing-Feigenbaum, U. Pruckner, A. Beyer, G. Sinn, A. Dinter, A. Mankertz, A. Siedler, A. Schubert, M. Suckau // *Euro Surveill.* – 2010. – V. 15. – P. 19527
153. Best, J. M. Maternal Rubella at St Thomas' Hospital in 1978 and 1986: Support for Augmenting the Rubella Vaccination Programme / J. M. Best, J. M. Welch, D. A. Baker, J. E. Banatvala // *Comparative Study Lancet.* – 1987. – Vol. 2 (8550). – P. 88-90.
154. Best, J. M. Reducing the global burden of congenital rubella syndrome: report of the World Health Organization Steering Committee on research related to measles and rubella vaccines and vaccination, June 2004 / J. M. Best, C. Castillo-

- Solorzano, J.S.Spika, J. Icenogle, J.W. Glasser, N.J. Gay, J. Andrus, A.M. Arvin // *J Infect Dis.* – 2005. – Vol. 192(11). – P. 1890–1897.
155. Binnicker, M. Multiplex detection of IgM and IgG class antibodies to *Toxoplasma gondii*, rubella virus, and cytomegalovirus using a novel multiplex flow immunoassay / M. Binnicker, D. Jespersen, J. Harring // *Clin Vaccine Immunol.* - 2010. – Vol. 17(11). – P. 1734–1738.
156. Blank, N.R. Exempting schoolchildren from immunizations: states with few barriers had highest rates of nonmedical exemptions // N.R. Blank, A.L. Caplan, C. Constable / *HealthAff.* - 2013. – Vol. 32. – P.1282–1290
157. Carman, W. Reverse transcription and subsequent DNA amplification of rubella virus RNA/ W. Carman, C. Williamson, B.A. Cunliff, A.H. Kidd // *J. Virol. Methods.* — 1989. — Vol. 25 (1). — P. 21–29.
158. Center for Disease Control(CDC). Rubella and congenital rubella syndrome – United States 1985-1988 // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep MMWR.* - 1989. - №38 (11). – P.173-178
159. Centers for Disease Control and Prevention. Global measles mortality, 2000—2008 / *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* - 2009. - Vol.58 (47). – P.1321–1326.
160. Centers for Disease Control and Prevention. Progress in Measles Control – Kenya 2002–2007/ *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – 2007. – Vol. 56(37). – P. 969–972.
161. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations from an Ad Hoc Meeting of the WHO Measles and Rubella Laboratory Network (LabNet) on Use of Alternative Diagnostic Samples for Measles and Rubella Surveillance / *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – 2008. - Vol. 57(24). - P. 657–660.
162. Charlton, C. L. How to determine protective immunity in the post-vaccine era / C. L. Charlton, F. Y. Lai, D. C. Dover. // *Human vaccines. Immunotherapeutics.* - 2016. - Vol.12 (4). – P. 903-906.
163. Chen, R.T. Measles antibody: reevaluation of protective titers / R.T. Chen, L.E. Markowitz, P. Albrect, J.A. Stewart, L.M. Mofenson, S.R. Preblud, W.A. Orenstein // *J. Infect. Dis.* – 1990. - Vol.162. -P. 1036-1042.

164. Cherry, J.D. Clinical Characteristics of Measles in Previously Vaccinated and Unvaccinated Patients in California / J.D. Cherry, M. Zahn // *Clin. Infect. Dis.* – 2018. - Vol. 67 (9). - P. 1315–1319.
165. Chess, S. Follow-up report on autism in congenital rubella / S. Chess // *J. Autism Child Schizophr.* - 1977. – Vol. 7 (1). - P. 69-81.
166. Christenson, B. Measles antibody: comparison of long-term vaccination titres, early vaccination titres and naturally acquired immunity to and booster effects on the measles virus / B. Christenson, M. Botting // *Vaccine.* – 1994. – Vol. 12(2). P. 129-133.
167. Cohen, D.J. Measles immunity testing: Comparison of two measles IgG ELISAs with plaque reduction neutralization assay / D.J. Cohen, R.P. Parry, D. Doblas, D. Samuel, L. Warrenner, N. Andrews, D. Brown // *J. of Virological Methods.* – 2006. Vol. 131(2). – P. 209-212.
168. Cowell, J. M. Measles / J. M. Cowell // *Journal of School Nursing.* - 2019. - Vol. 35(4). – P. 241.
169. Cześćnik, A. Response of viral specific CD4 T cells to in vitro stimulation with vaccine and wild measles virus strains in vaccinated and naturally infected subjects Pol / A. Cześćnik, M. Dunal-Szczepaniak, A. Trzcińska, J. Siennicka // *J. Microbiol.* – 2014. – Vol. 63(2). – P. 203-209.
170. Do, T.T.T. Rubella Vaccination Coverage Among Women of Childbearing Age in Vietnam / T.T.T. Do, A.N. Nguyen, X.T.T. Le, A. Pongsakul, Q.N. Nguyen, T.V. Nguyen, T.H. Nguyen, T.M. Do, H.T. Le, H.L.T. Nguyen, N.T. Truong, C.L. Hoang, G.T. Vu, T.T. Tran, T.H. Tran, B.X. Tran, C.A. Latkin, C.S. Ho, R.C. Ho // *Int. J. Environ Res Public Health.* - 2019. - 16 (10). – P. 1741
171. Dorigo-Zetsma, J.W. Immune status of health care workers to measles virus: evaluation of protective titers in four measles IgG EIAs / J.W. Dorigo-Zetsma, M.A. Leverstein-van Hall, J. Vreeswijk, J.J. de Vries, A.C. Vossen, H.I. Ten Hulscher, J. Kerhof, G.P. Smits, W.L. Ruijs, M.P. Koopmans, R.S. Binnendijk // *Journal of Clinical Virology.* – 2015. Vol. 69. – P. 214-218.

172. Dubé, È. Managing the risks of vaccine hesitancy and refusals / È. Dubé, N.E. MacDonald // *Lancet Infect Dis.* - 2016. Vol. 16. – P.518–519.
173. Durrhem, D.N. Assessing population immunity for measles elimination – The promise and peril of serosurveys / D.N. Durrhem, W.A. Orenstein, W.W. Schluter // *Vaccine.* – 2018. -Vol.36 (28). – P. 4001-4003.
174. Eaton, L. Measles cases in England and Wales rise sharply in 2008 / L. Eaton // *BMJ.* – 2009. – Vol. 338. – P. 533.
175. Edirisuriya, C. Australian rubella serosurvey 2012–2013: On track for elimination? / C. Edirisuriya, F. H. Beard, A. J. Hendry, A. Dey, H. F. Gidding, L. Hueston, D. E. Dwyer, J. G. Wood, K. K. Macartney, P. B. McIntyre // *Vaccine.* - 2018. – Vol. 36 (20). – P. 2794-2798.
176. Editorial, L. Measles eradication: A goal within reach, slipping away / L. Editorial // *Lancet.* – 2019. – Vol. 393. - P. 1669.
177. Eggerding, F.A. Detection of rubella virus gene sequences by enzymatic amplification and direct sequencing of amplified DNA / F.A. Eggerding, J. Peters, R.K. Lee, C.B. Inderlied // *J. Clin. Microbiol.* — 1991. — Vol. 29(5). — P. 945 –952 .
178. Enders, J.E. Propagation in tissue cultures of cytopathic agents from patients with measles / J.E. Enders, T.C. Peebles // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1954. – Vol. 86. - P. 277-286.
179. Esteghamati, A. Progress in measles and rubella elimination in Iran / A. Esteghamati, M.M. Gouya, S.M. Zahraei, M.N. Dadras, A. Rashidi, F. Mahoney // *Pediatr Infect Dis J.* – 2007. - 26(12). P. 1137-1141.
180. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Epidemiological update: Measles - monitoring European outbreaks, 7 July 2017. Stockholm: ECDC; (Accessed 31 Aug 2017). Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-measles-monitoring-european-outbreaks-7-july-2017>.
181. European Centre for Disease Prevention and Control. Measles and rubella surveillance – 2017. The annual report on measles and rubella for 2017 is based

- on surveillance data retrieved from the European Surveillance System (TESSy) on 28 February 2018. Available at: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/annual-measles-and-rubella-monitoring-report-2017>
182. Facciolà. Perception of rubella risk in pregnancy: an epidemiological survey on a sample of pregnant women / Facciolà, Squeri, Genovese, Alessi, La Fauci. // *Annali di Igiene*. - 2019. –Vol. 31(2 Supple 1). – P. 65-71
 183. Fernandez, R.C. Determinants of apparent rural-urban differentials in measles vaccination uptake in Indonesia / R.C. Fernandez, N. Awofeso, A. Rammohan, // *R. Remote Health*. - 2011. - Vol. 11(3). – P. 1702.
 184. Filia, A. Ongoing outbreak with well over 4,000 measles cases in Italy from January to end August 2017 – what is making elimination so difficult? / A. Filia, A. Bella, M. Del Manso, M. Baggieri, F. Magurano, M. C. Rota // *Euro Surveill*. - 2017. - Vol. 22(37). - P. ?.
 185. Forbes, J.A. Rubella: historical aspects / J.A. Forbes // *Am J Dis Child*. – 1969. – Vol. 118(1). – P. 5–11.
 186. Frey, T.K. Molecular biology of rubella virus /T.K. Frey // *Adv Virus Res*. – 1994. – Vol. 44. – P. 64–159.
 187. Fujino, M. Development of a new neutralization test for measles virus / M. Fujino, N. Yoshida, K. Kimura, J. Zhou, Y. Motegi, K. Komase, T. Nakayama // *J.Virological Methods*. – 2007. – Vol. 142 (1-2). – P. 15-20.
 188. Gellin, B.G. Do parents understand immunizations? A national telephone survey / B.G. Gellin, E.W. Maibach, E.K. Marcuse // *Pediatrics*. - 2000. – Vol. 106 (5). – P. 1097–10102.
 189. George, S. Molecular aspects of the teratogenesis of rubella virus / S. George, R. Viswanathan, G.N.Sapkal// *Biological Research*. – 2019. – Vol. 52 (10). – P. 47-54.
 190. Gianfredi, V. Polio and measles: reasons of missed vaccination in Italy,2015-2017 / V. Gianfredi, F. D'Ancona, F. Maraglino , C. Cenci , S. Iannazzo // *Ann Ig*. – 2019. – Vol. 31 (3). – P. 191-201.

191. Greenberg, M. Frequency of defects in infants whose mothers had rubella during pregnancy / M. Greenberg, O. Pellitteri, J. Barton // JAMA. – 1957. – Vpl. 165(6). – P. 675–678.
192. Gregg, N.M. Congenital cataract following German measles in the mother. 1941 / N.M. Gregg // Aust N Z J Ophthalmol. - 1991. – Vol. 19(4). – P. 267-276.
193. Griffin, D.E. Fields Virology, Chapter 44, Measles Virus/D.E. Griffin, D.M. Knipe, P.M. Howly (Eds.). Fifth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 3177 p.
194. Griffin, D.E. Measles Vaccine / D.E. Griffin // Viral Immunology. – 2018. - Vol. 31 (2). P. 86–95.
195. Haralambieva, I. H. Current perspectives in assessing humoral immunity after measles vaccination Expert Rev /I. H. Haralambieva, R. B.Kennedy, I. G. Ovsyannikova, D.J.Schaid, G.A. Poland // Vaccines. - 2019.- Vol. 18 (1). - P. 75–87.
196. Haralambieva, I.H. Associations Between Single Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes in Cytokine and Cytokine Receptor Genes and Immunity to Measles Vaccination / I. H. Haralambieva, I.G. Ovsyannikova, R.B. Kennedy, R.A. Vierkant, V. Shane Pankrat., R. M. Jacobson, G.A. Poland // Vaccine. – 2011. - Vol. 29(45). – P. 7883–7895.
197. Hartter, H.K. Evaluation of different measles IgG assays based on recombinant proteins using a panel of low-titre sera / H.K. Hartter, R.L. de Swat, F. Hanes, H.W. Vos, F.B. Bouche, A.D. Osterhaus, F. Schneider, C.P. Muller // J.Virol. Methods. 2000.- Vol. 84(2). - P. 191-200.
198. Hatchette, N.F. Calibration and Evaluation of Quantitative Antibody Titers for Measles Virus by Using the BioPlex 2200 /N.F. Hatchette, H. Scholz, S. Bolotin, N.S. Crowcroft, C. Jackson, E. McLachlan, A. Severini // Clin Vaccine Immunol. – 2017. –Vol. 24 (1). - P. 269-16.
199. Hausman, B.L. Poisonous, filthy, loathsome, damnable stuff[®]: the rhetorical ecology of vaccination concern / B.L. Hausman, M. Ghebremichael, P. Hayek, E. Mack // Yale J Biol Med. - 2014. Vol. 87 (4). – P. 403–416.

200. Haver, E. Panum on Measles: Observations Made During the Epidemis of Measles on the Faroe Islands in the Year 1846 (A translation from the Danish) / E. Haver // *Am J Pudlic Health Nations Health*. -1940. – Vol. 30 (10). – P.1245-1246.
201. Hu, M. Accuracy analysis and comparison of different serological detection methods in syphilis / M. Hu, N. Liu, YY. Cai, T. Lei, M. Zhang // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. -2017. – Vol. 97(36). – P. 2844-2847.
202. Hviid,A. Measles, Mumps, Rubella Vaccination and Autism: A Nationwide Cohort Study / A. Hviid, J.V. Hansen, M. Frisch, M. Melbye, // *Ann. Intern. Med.* – 2019. – Vol. 170 (8). – P. 513–520.
203. Inaida, S. Measles elimination and immunisation: national surveillancetrends in Japan, 2008–2015 / S.Inaida, S. Matsuno, F. Kobune // *Epidemiol. Infect.* – 2017. -№145.- P. 2374–2381.
204. ISO/IEC Guide 2:2004 Standardization and related activities – general vocabulary. Eighth edition 2004, - 76 p.
205. Itoh,M. Comparative analysis of titers of antibody against measles virus in sera of vaccinated and naturally infected Japanese individuals of different age grous / M. Itoh, Y. Okuno, H.Hotta // *Journal of Clinical Microbiology*. 2002. Vol. 40 (5). – P. 1733-1738.
206. Jarrett, C. Strategies for addressing vaccine hesitancy - a systematic review / C. Jarrett, R. Wilson, M. O’Leary, E. Eckersberger, H.J. Larson, SAGE Working Group on Vaccine Hesitancy. // *Vaccine*. - 2015. – Vol. 33 (34). – P. 4180–4190.
207. Jin, L. Application of molecular and serological assays to case based investigations of rubella and congenital rubella syndrome / L. Jin, B. Thomas // *J. Med. Virol.* — 2007. — Vol. 79(7). — P. 1017–1024.
208. Johnstone, P. Detection of the 5’ region of the rubella virus in clinical samples by polymerase chain reaction / P. Johnstone, T.J. Bosma, E.J. Whitby, J.M. Best, P.G. Sanders // *Clin. Diagn. Virol.* — 1996. — Vol. 5 (5). — P. 55–60.

209. Karade, S. Measles, mumps, and rubella: A cross-sectional study of susceptibility to vaccine-preventable diseases among young people in India // S.Karade, S. Sen, V.K. Sashindran, P. Sharma, M.Kanitkar // *Med J Armed Forces India*. 2019. –Vol. 75(1). – P. 70–73.
210. Kasper, S. Measles outbreak in Styria, Austria, March-may 2009/ S. Kasper, H. Holzmann, S.W. Aberle, M. Wassermann-Neuhold, H.Gschiel, O. Feenstra, F. Allerberger, D. Schmid // *Euro Surveill*. – 2009. – Vol. 14 (40). – P.?.
211. Kata, A. A postmodern Pandora's box: anti-vaccination misinformation on the Internet / A. Kata // *Vaccine*. - 2010. – Vol. 28 (7). – P.1709–1716.
212. Kata, A. Anti-vaccine activists, Web 2.0, and the postmodern paradigm—an overview of tactics and tropes used online by the anti-vaccination movement / A. Kata // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30 (25). – P. 3778–3789.
213. Katow, S. Rubella virus genome diagnosis during pregnancy and mechanism of congenital rubella / S. Katow//*Intervirology*. – 1999. - Vol. 41(4–5). – P. 163–169.
214. Kestenbaum, L.A. Identifying and addressing vaccine hesitancy / L.A. Kestenbaum, K.A. Feemster // *Pediatr Ann*. - 2015. – Vol. 44 (4). – P. 71–75.
215. Khan,A. Rubella seroprevalence and demographic feature analysis in pregnant women from Southern Pakistan / A. Khan ,H. Rahman ,R. Noushin, S.I. Anjum ,F. Saad ,K. UllahK// *JPakMedAssoc*. – 2019. – Vol. 69(8). P. 959-963.
216. Kim,J. Identification of performance problems in a commercial human immunodeficiency virus type 1 enzyme immunoassay by multi user external quality control monitoring and real-time data analysis / J. Kim, C. Swantee, B. Lee, H. Gunning, A. Chow, F. Sidaway, C. Sherlock, R. Garceau, W. Dimech, L. Malloch // *J. Clin. Microbiol*. – 2009. - Vol. 47(10). – P. 3114–3120.
217. Kosack, C.S.A guide to aid the selection of diagnostic tests/ C.S. Kosack,A.L. Page, P.R. Klatser // *Bull World Health Organ*. - 2017. – Vol. 95 (9). – P. 639–645.

218. Kruk, T. Results of Continuous Monitoring of the Performance of Rubella Virus IgG and Hepatitis B Virus Surface Antibody Assays Using Trueness Controls in a Multicenter Trial / T. Kruk, S. Ratnam, J. Preiksaitis, A. Lau, T. Hatchette, G. Horsman, P. Van Caesele, B. Timmons, G. Tipples // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2012. – Vol.19(10). – P. 1624–1632.
219. Lambert, H.P. Congenital rubella syndrome / H.P. Lambert, H. Stern, A.J.Wellsted. // *Lancet*. – 1965. – Vol. 2. – P. 826–827.
220. Lee, J.Y. Rubella virus replication and links to teratogenicity /J.Y. Lee, D.S. Bowden // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2000. – Vol.13 (4). – P. 571-587.
221. Levin A. Global eradication of measles: an epidemiologic and economic evaluation /A.Levin, C. Burgess, L.P. Garrison, C.Bauch, J.Babigumira, E. Simons, A.Dabbagh. // *J. Infect Dis.* – 2011. - Vol. 204 (1). –P. 98-106.
222. Lisowski, B. Outbreaks of the measles in the Dutch Bible Belt and in other places - New prospects for a 1000 year old virus //B.Lisowski, S. Yuwan, M. Bier // *Biosystems*.- 2019.- Mar. -177. -P.16-23.
223. Lundstrom, R. Rubella during pregnancy: a follow-up study of children born after an epidemic of rubella in Sweden, 1951, with additional investigations on prophylaxis and treatment of maternal rubella/ R. Lundstrom// *Acta Paediatr Scand.* – 1962. – Vol. 133(1). – P. 1-110.
224. Luthy, K.E. Reasons parents exempt children from receiving immunizations / K.E.Luthy, R.L.Beckstrand, L.C. Callister, S.Cahoon // *J Sch Nurs.* – 2012. – Vol. 28(2). – P. 153-160.
225. Manikkavasagan, G. The rationale for the use of measles post-exposure prophylaxis in pregnant women: a review / G. Manikkavasagan, M. Ramsay // *J. ObstetGynaecol.* – 2009. - 29 (7). – P. 572-575.
226. Manikkavasagan, G. The rationale for the use of measles post-exposure prophylaxis in pregnant women: a review/ .Manikkavasagan, K. Brown, M. Ramsay // *Journal of Obstetrics and Gynaecology.* – T. 29(7). – P.574-577
227. Markey, K. Improvement in serological diagnosis of pertussis by external quality assessment / K. Markey, A. Douglas-Bardsley, C. Asokanathan, N.K.

- Fry, A.M. Barkoff, S. Bacci, C. Ködmön, Q. He // *Journal of Medical Microbiology*. - 2019. – Vol. 68 (5) – P.741–747.
228. Martínez-Torres, A. O. Genetic Characterization of Rubella Virus Strains Detected in Spain, 1998-2014/O. A. Martínez-Torres, M. M. Mosquera, F. D.Ory, A. González-Praetorius, J. E. Echevarría // *PLoS One*. – 2016. – Vol.11 (9). – P. 1371
229. Masern RKI-Ratgeber/ Robert Koch-Institut (RKI). - Available at: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Masern
230. Mashuda, F. Pattern and factors associated with congenital anomalies among young infants admitted at Bugando medical centre, Mwanza, Tanzania / F. Mashuda, A. Zuechner, P.L. Chalya, B.R. Kidenya, M. Manyama // *BMC Res Notes*. – 2014. – Vol.7(1). P. 195.
231. Metcalf, C.J. Impact of birth rate, seasonality and transmission rate on minimum levels of coverage needed for rubella vaccination / C.J. Metcalf, J.Lessler, P.Klepac, F.Cutts, B.T. Grenfell. // *Epidemiol Infect*. – 2012. – Vol. 140(12). – P. 2290-2301.
232. Miller, E. The epidemiology of rubella in England and Wales before and after the 1994 measles and rubella vaccination campaign: fourth joint report from the PHLS and the National Congenital Rubella Surveillance Programme / E. Miller, P. Waight, N. Gay, M. Ramsay, J. Vurdien, P. Morgan-Capner, L. Hesketh, D. Brown, P. Tookey, C. Peckham // *Commun Dis Rep CDR Rev*. – 1997. – Vol. 7(2). – P. 26-32.
233. Mina,M.J. Long-term measles-induced immunomodulation increases overall childhood infectious disease mortality / M.J. Mina, C.J. Metcalf,. de R.L. Swart, A.D. Osterhaus, B.T. Grenfell // *Science*. – 2015. – Vol. 348 (6235). – P. 694–699.

234. Mirambo, M. M. Serological Markers of Rubella Infection in Africa in the Pre Vaccination Era: A Systematic Review / M. M.Mirambo, M.Majigo, S.Aboud, U.Groß, S. E.Mshana// BMC Res. – 2015. Vol. 8 (25). – P. 716.
235. Mitchell, L.A. Serologic responses to measles, mumps, and rubella (MMR) vaccine in healthy infants: Failure to respond to measles and mumps components may influence decisions on timing of the second dose of MMR / L.A. Mitchell, A.J. Tingle, D. Décarie, C. Lajeunesse // Canadian Journal of Public Health. – 1998. - Vol. 89 (5). P. 325–328.
236. Miyakawa, M. Seroprevalence of rubella in the cord blood of pregnant women and congenital rubella incidence in Nha Trang, Vietnam / M. Miyakawa, H. Yoshino, L.M.Yoshida, E. Vynnycky, H.Motomura, V.D. Thiem, K. Ariyoshi, D.D. Anh, H. Moriuchi, // Vaccine. - 2014. – Vol. 32 (10). – P. 1192–1198.
237. Mulders, M.N. Global measles and rubella laboratory network support for elimination goals, 2010 – 2015 / M.N. Mulders, P.A. Rota, J.P. Icenogle, K.E. Brown, M. Takeda, G.J. Rey, M.C. Ben Mamou, A.R.Dosseh, C.R.Byabamazima, H.J. Ahmed, S.Pattamadilok, Y. Zhang, M.Gacic-Dobo, P.M.Strebel, J.L. Goodson // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. - 2016. Vol. 65(6). – P.438-442.
238. Muller, C.P. Measles elimination: old and new challenges? / C.P. Muller // Vaccine. – 2001. – Vol.19(17-19). – P. 2258-2261.
239. Ngaovithunvong, V. Mumps antibody in the Thai population 17 years after the universal measles mumps rubella vaccination program. / V. Ngaovithunvong, N. Wanlapakorn, L. Tesapirat, N. Suratannon, Y. Poovorawan // *Journal of infection in developing countries*. – 2016. - Vol.10(7). - P. 735–740.
240. Offit, P.A. Addressing parents' concerns: do multiple vaccines overwhelm or weaken the infant's immune system? / P.A. Offit, J. Quarles, M.A. Gerber, C.J. Hackett, E.K. Marcuse, T.R. Kollman, B.G. Gellin, S. Landry // Pediatrics. – 2002. – Vol. 109 (1). – P. 124–129.

241. Offit, P.A. Addressing parents' concerns: do vaccines contain harmful preservatives, adjuvants, additives, or residuals? / P.A. Offit, R.K. Jew // *Pediatrics*. – 2003. – Vol. 112(6 Pt 1). – P. 1394–1397.
242. Orenstein, WA. The theory of measles elimination: implications for the design of elimination strategies / W.A. Orenstein, N.J. Gay // *J Infect Dis*. – 2004. – Vol. 189 (1). – P. 27–35.
243. Orsoo, O. Epidemiological characteristics and trends of a Nationwide measles outbreak in Mongolia, 2015-2016 / O. Orsoo, Y.M Saw, E. Sreenen, B. Yadamsuren, A. Byambaa, T. Kariya, E. Yamamoto, N. Hamajima // *BMC Public Health*. – 2019. - Vol. 19(1). - P.201.
244. Ovsyannikova, I.G. Immunologic significance of HLA class I genes in measles virus-specific IFN-gamma and IL-4 cytokine immune responses / I.G. Ovsyannikova, J.E. Ryan, R.A. Vierkant, V.S. Pankratz, R.M. Jacobson, G.A. Poland. // *Immunogenetics*. -2005. - Vol. 57 (11). - P. 828-836.
245. Parent du Châtelet, I. Measles resurgence in France in 2008, a preliminary report / I. Parent du Châtelet, D. Floret, D. Antona, D. Lévy-Bruhl // *Euro Surveill*. – 2009. – V. 14 (6). – P. ?
246. Patel, M.K. Progress toward regional measles elimination — worldwide, 2000–2015 / M. K. Patel, M. Gacic-Dobo, P. M. Strebel, A. Dabbagh, M. N. Mulders, Jean-Marie Okwo-Bele, L. Dumolard, P. A. Rota, K. Kretsinger, J. L. Goodson // *Morb Mortal Wkly Rep*. – 2016. – Vol. 65(44). – P. 1228–1233.
247. Perry, R.T. The clinical significance of measles: A review / R.T. Perry, N.A. Halsey // *J. Infect. Dis*. - 2004. – Vol. 189 (1). -P. 4–16.
248. Plotkin, S.A. Birth and death of congenital rubella syndrome / S.A. Plotkin // *JAMA*. – 1984. – V. 251(15). P. 2003-2004.
249. Poland, G.A. The age-old struggle against the antivaccinationists / G.A. Poland, R.M. Jacobson // *N Engl J Med*. – 2011. - 364 (2). – P.97–99.
250. Ramsay, M. / Doc.: CMDS 01 01 02/13, 15th meeting of the European Advisor Group on EPI, Wsrasow, Poland, 9-10 November – 1998.

251. Ratnam, S. Comparison of Commercial Enzyme Immunoassay Kits with Plaque Reduction Neutralization Test for Detection of Measles Virus Antibody / S. Ratnam, V. Gadag, R. West, J. Burris, E. Oates, F. Stead, N. Bouiliane // *Journal of Clinical Microbiology* // 1995 . –Vol. 33(4). - P. 811-815.
252. Rota,P.A. Molecular Epidemiology of Measles Virus / P.A. Rota, D.A. Featherstone, W.J. Bellini. // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2009. – Vol. 330. – P. 129-150.
253. Rota, P.A. Global distribution of measles genotypes and measles molecular epidemiology / P.A. Rota, K. Brown, A.Mankertz, S.Santibanez, S.Shulga, C.P. Muller, J.M.Hübschen, M. Siqueira, J. Beirnes, H. Ahmed, H.Triki, S. Al-Busaidy, A.Dosseh, C.Byabamazima, S. Smit, C.Akoua-Koffi, J.Bwogi, H. Bukenya, N.Wairagkar, N.Ramamurty, P.Incomserb, S.Pattamadilok, Y.Jee, W. Lim, W. Xu, K.Komase, M. Takeda, T. Tran, C. Castillo-Solorzano, P. Chenoweth, D. Brown, M.N. Mulders, W.J. Bellini, D. Featherstone // *J Infect Dis.* - 2011. – Vol. 204(1). – P. 514-523.
254. Rota, P.A. Molecular epidemiology of measles viruses in the United States, 1997–2001 / P.A. Rota, S.L. Liffick, J.S. Rota, R.S. Katz, S. Redd, M. Papania // *Emerg Infect Dis.* – 2002. - T. 8. – P.902–908.
255. Sadaf, A. A systematic review of interventions for reducing parental vaccine refusal and vaccine hesitancy / A. Sadaf, J.L. Richards, J. Glanz,D.A. Salmon, S.B. Omer // *Vaccine.* – 2013. – Vol. 31 (40). – P. 4293–4304.
256. Salmon, DA. Factors associated with refusal of childhood vaccines among parents of school-aged children: a case-control study / D.A .Salmon, L.H. Moulton, S.B. Omer,M.P. DeHart, S. Stokley, N.A. Halsey // *Arch PediatrAdolesc Med.* - 2005. – Vol. 159 (5). – P. 470–476.
257. Santibane, S. Molecular surveillance of measles and rubella in the WHO European Region: new challenges in the elimination phase / S.Santibanez, J.M.Hübschen, M.C. Ben Mamou, M. Muscat, K.E. Brown, R. Myers, O.DonosoMantke, H. Zeichhardt, D. Brockmann, S.V. Shulga, C.P. Muller, P.M.

- O'Connor, M.N. Mulders, A. Mankertz // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2017. – Vol. 23. – P. 516-523.
258. Seward, J.F. A rare event: A measles outbreak in a population with high 2-dose measles vaccine coverage /J.F. Seward, W.A. Orenstein. // *Clinical Infectious Diseases*.- 2012. - Vol.55(3). P. 403–405.
259. Shekarchi, I.C. Comparison of hemagglutination inhibition test and enzyme-linked immunosorbent assay for determining antibody to rubella virus / I.C. Shekarchi, J.L. Sever, N. Tzan, A. Ley, L.C. Ward, D. Madden // *J Clin Microbiol*. – 1981. – Vol. 13(5). – P.850-854.
260. Smith, T.C. Vaccine Rejection and Hesitancy: A Review and Call to Action/ T.C. Smith // *Infectious Diseases*. – 2017. – Vol. 4(3). – P. 146.
261. Smits, G. Seroprevalence of Rubella Antibodies in The Netherlands After 32 Years of High Vaccination Coverage / G. Smits, L. Mollema, S. Hahné, H. de Melker, I. Tcherniaeva, F. van der Klis, G. Berbers // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32 (16). – P.1890-1895.
262. Souza, V.A. Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) for measles antibody. A comparison with haemagglutination inhibition, immunofluorescence and plaque neutralization test /V.A.Souza, I. M Pannuti. Sumita,P.Albreht. // *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. – 1991. – Vol. 33 (1). – P. 32-36.
263. Stittelaar, K.J. Osterhaus Vaccination against measles: a neverending story/ K. J. Stittelaar, R. L. de Swart, A. D M E. // *Expert Rev Vaccines*. - 2002. - №1(2). – P 151-159.
264. Sugerman, D. E. Measles outbreak in a highly vaccinated population, San Diego, 2008: role of the intentionally undervaccinated/ D. E. Sugerman, A. E. Barskey, M. G. Delea, I.R. Ortega-Sanchez, D. Bi, K.J. Ralston, P.A. Rota, K. Waters-Montijo, C.W. Lebaron // *Pediatrics*. – 2010. – Vol. 125 (4). - P. 747-755.
265. Tangherlini, T.R. “Mommy blogs” and the vaccination exemption narrative: results from a machine-learning approach for story aggregation on parenting

- social media sites / T.R. Tangherlini, V. Roychowdhury, B. Glenn, C.M. Crespi, R. Bandari, A. Wadia, M. Falahi, E. Ebrahimzadeh, R. Bastani. // *JMIR Public Health Surveill.* – 2016. -Vol. 22, 2(2). – P. 166.
266. Thompson, K.M. Modeling the transmission of measles and rubella to support global management policy analyses and eradication investment cases / K.M. Thompson, N.D. Badizadegan // *Risk Anal.* - 2017. – Vol.37(6). – P. 1109–1131.
267. Tischer, A. Immune response after primary and re-vaccination with different combined vaccines against measles, mumps, rubella /A. Tischer, E. Gerike // *Vaccine.* - 2000. – Vol.18 (14). - P. 1382-1392.
268. Tischer, A. Standardization of measles, mumps and rubella assays to enable comparisons of seroprevalence data across 21 European countries and Australia /A. Tischer, N. Andrews, G. Kafatos, A. Nardone, G. Berbers, I. Davidkin, Y. Aboudy, J. Backhouse, C. Barbara, K. Bartha, B. Bruscova, A. Durs, A. Griskevicius, L. Hesketh, K. Jonansen, L. Jones, O. Kuersteiner, E. Lupulescu, Z. Mihneva, M. Mrazova, F. De Ory, K. Prosenc, F. Schneider, A. Tsakris, M. Smelhausova, R. Vranckx, M. Zarvou, E. Miller // *Epidemiology and Infection.* – 2007. – Vol. 135 (5). P. 777-797.
269. Tischer, A. Vaccinated students with negative enzymeimmunoassay results show positive measles virus- specific antibody levels by immunofluorescence and plaque neutralization test / A. Tischer, M. Gassner, J.-L. Richard, Suter- F. Riniker, A. Mankertz, U. Heininger // *J. Clin. Virol.* - 2007. - Vol.38. - P. 204–209.
270. Toda, K. Congenital rubella syndrome (CRS) in Vietnam 2011–2012—CRS epidemic after rubella epidemic in 2010–2011 /K. Toda,S.Reef, M.Tsuruoka, M. Iijima, T.H. Dang, T.H. Duong, V.C. Nguyen, T.H. Nguyen // *Vaccine.* – 2015. – Vol. 33(31). – P. 3673–3677.
271. Toizumi, M. Clinical manifestations of congenital rubella syndrome: A review of our experience in Vietnam /M. Toizumi, H. M. Vo, D. A. Dang, H. Moriuchi, L-M. Yoshida // *Vaccine.*- 2019.- T.37(1). - P202-220.

272. Van den Ent, M. Measles mortality reduction contributes significantly to mortality among children less than five years of age, 1990–2008 / M. Van den Ent, D.W. Brown, E.J. Hoekstra, A. Christie, S.L. Cochi // *J Infect Dis.* – 2011. - Vol.203. - P. 18-23.
273. Varsanyi, T.M. Purification, Morphology and Antigenic Characterization of Measles Virus Envelope Components / T.M.Varsanyi, G. Utter, E.Norrby. // *J Gen Virol.* – 1984. – Vol. 65 (Pt 2). – P. 355-366.
274. Vauloup-Fellous. Standardization of rubella immunoassays / Vauloup-Fellous // *J. Clin.Virol.* – 2018. – Vol. 102. - P. 34-38.
275. Virus taxonomy, 6th report of the International Committee on taxonomy of viruses // *Arch Virol Suppl.* – 1995. – Vol.10. – P. 1–586.
276. Voigt, E.A. Genetically defined race, but not sex, is associated with higher humoral and cellular immune responses to measles vaccination / E.A. Voigt, I.G. Ovsyannikova, I.H. Haralambieva, R.B. Kennedy, B.R. Larrabee, D.J. Schaid, G.A. Poland // *Vaccine.* – 2016. - Vol.34 (41). – P. 4913–4919.
277. Vynnycky, E. Using seroprevalence and immunisation coverage data to estimate the global burden of congenital rubella syndrome, 1996-2010: a systematic review /E. Vynnycky, J. E. Adams, F. T. Cutts, S. E. Reef, A. M. Navar, E. Simons, Lay-Myint Yoshida, D. W. J. Brown, C. Jackson, P. M. Strebel, A. J. Dabbagh // *PLOS One.* - 2016. – Vol. 10(3). – P. 149-160.
278. Wesolowski, A. Measles outbreak risk in Pakistan: exploring the potential of combining vaccination coverage and incidence data with novel data-streams to strengthen control / A. Wesolowski, A. Winter, A.J. Tatem, T. Qureshi, K. Engø-Monsen, C.O. Buckee, D.A.T. Cummings, C.J.E. Metcalf // *Epidemiology Infection*- 2018. – Vol. 146 (12). – P. 1575-1583.
279. Westgard, J.O. A Total Quality-Control Plan with Right-Sized Statistical Quality-Control // J.O. Westgard // *Clin Lab Med.* – 2017. Mar. - 37(1). P.137-150.

280. Westgard, J.O. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry/ J.O. Westgard, P.L. Barry, M.R. Hunt, T. Groth//Clin. Chem. – 1981. -Vol. 27 (3). – P. 493–501.
281. Westgard, J.O. The quality of laboratory testing today: an assessment of s metrics for analytic quality using performance data from proficiency testing surveys and the CLIA criteria for acceptable performance / J. O. Westgard, S. A. Westgard //Am J Clin Pathol. – 2006. – Vol. 125 (3). – P. 343–354.
282. Westgard, J.O. Quality control review: implementing a scientifically based quality control system / J. O. Westgard, S. A. Westgard // Ann Clin Biochem. - 2016. - Vol. 53(1). – P. 32–50.
283. Wittenburg, R.A. Comparative evaluation of commercial rubella virus antibody kits / R.A. Wittenburg, M.A. Roberts, L.B. Elliott, L.M. Little // J Clin Microbiol. – 1985. – Vol. 21(2). – P.161-163.
284. Wolfson, L.J. Estimating the Costs of Achieving the WHO-UNICEF Global Immunization Vision and Strategy, 2006-2015 / L.J. Wolfson, F. Gasse, Shook-Pui Lee-Martin, P.Lydon, A.Magan, A.Tibouti, B. Johns, R.Hutubessy, P. Salama, Jean-Marie Okwo-Bele. // Bull World Health Organ. – 2008. – Vol. 86 (1). – P. 27-39.
285. World Health Organization (WHO). Report of a meeting on preventing congenital rubella syndrome: immunization strategies, surveillance needs. Geneva: 2000.
286. World Health Organization (WHO).WHO position paper on rubella vaccines.WklyEpidemiolRec. – 2000. – Vol. 75. P. 161–172.
287. World Health Organization (WHO). Manual for the Laboratory Diagnosis of Measles and Rubella Virus Infection, 2-nd. Geneva. Switzerland: WHO, 2006, P. 58-65.
288. World Health Organization (WHO). Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. Second edition. World Health Organization 2007. P. 119.

289. World Health Organization (WHO). Rubella vaccines: WHO Position paper/ WHO // Wkly Epidemiol Rec. - 2011. – Vol. 86(29). – P. 301–316.
290. World Health Organization (WHO). Proceedings of the Global Technical Consultation to Assess the Feasibility of Measles Eradication, 28–30 July 2010/ WHO // J Infect Dis. – 2011. – Vol. 204(1). – P. 4–13.
291. World Health Organization (WHO). Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection. WHO European Region strategic plan 2005–2010 / World Health Organization 2012. – 44 p. Available at http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0008/79028/E87772.pdf
292. World Health Organization (WHO). Global Measles and Rubella. Strategic Plan 2012-2020/ World Health Organization 2012. – 44 p. Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44855/9789241503396_eng.pdf?sequence=1
293. World Health Organization (WHO). Measles virus nomenclature update: 2012 // Wkly Epidemiol Rec. - 2012. – Vol. 87(9). – P. 73-81.
294. World Health Organization (WHO). Rubella virus nomenclature update: 2013// Wkly Epidemiol Rec. - 2013. – Vol. 88 (32). – P. 337–343.
295. World Health Organization (WHO). Global vaccine action plan 2011–2020 // Geneva Switzerland: World Health Organization. -2013. Available at: http://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/en/
296. World Health Organization (WHO). Regional Office for Europe. Eliminating measles and rubella/ Framework for the verification process in the WHO European Region. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe. – 2014, - 28 p.
297. World Health Organization (WHO). Genetic diversity of wild-type measles viruses and the global measles nucleotide surveillance database (MeaNS). Wkly Epidemiol Rec. - 2015. – Vol. 90 (30). – P. 373-80.
298. World Health Organization (WHO). Meeting of the International Task Force for Disease Eradication, November 2015 / WHO // Wkly Epidemiol Rec. – 2016. – Vol. 91(6). – P. 61–71.

299. World Health Organization (WHO). Measles vaccines: WHO position paper – April 2017/ WHO //Wkly Epidemiol Rec.- 2017. Vol. 92 (17). – P. 205–228.
300. World Health Organization (WHO). Manual for the Laboratory-based Surveillance of Measles, Rubella, and Congenital Rubella Syndrome; 3rd ed. Geneva. Switzerland: WHO. – 2018. P. 583. http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/laboratory/manual/en/
301. World Health Organization (WHO). Measles and Rubella Surveillance Data. Available at: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/active/measles_monthlydata/en/
302. World Health Organization (WHO). Measles and Rubella surveillance data. 2019. Available at: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/active/measles_monthlydata/en/
303. World Health Organization (WHO). Measles in Europe: record number of both sick and immunized WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, 7 February 2019. Available at: <http://www.euro.who.int/en/media-centre/sections/press-releases/2019/measles-in-europe-record-number-of-both-sick-and-immunized>
304. Zhou, Q. Rubella Virus Immunization Status in Preconception Period Among Chinese Women of Reproductive Age: A Nation-Wide, Cross-Sectional Study /Q. Zhou, Q. Wang, H. Shen, Y. Zhang, S. Zhang, X. Li, G. Acharya // Vaccine. – 2017. – Vol. 35(23). – P. 3076-3081.
305. Zimmerman, L.A. Progress toward measles elimination — European Region, 2009–2018 / L. A. Zimmerman, M. Muscat, S. Singh, M. B. Mamou, D. Jankovic, S. Datta, J. P. Alexander, J. L. Goodson, P. O'Connor // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. - 2019. – Vol. 68(17). – P. 396–401.