

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Центральная научно-исследовательская лаборатория

А. С. Рудницкая

**ОСНОВНЫЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ИММУНОФЕРМЕНТНОМУ АНАЛИЗУ
ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МЕТОДИК
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ВИРУСОВ
ГЕПАТИТОВ И АНТИТЕЛ К НИМ**

Учебно-методическое пособие

Гомель 2007

УДК 616.36-002:616-097

ББК 54.141+28.073

Р 83

Автор: А. С. Рудницкая

Рецензенты: канд.мед.наук., доцент, зав. кафедрой общей гигиены, экологии и радиационной медицины Гомельского государственного медицинского университета **В. Н. Бортновский**; канд.мед.наук., зав. клинико-диагностической лабораторией ГУ РНПЦ «Мать и дитя» **Н. Л. Сергейчик**

А. С. Рудницкая

Р 83 Основные рекомендации по иммуноферментному анализу при выполнении методик определения антигенов вирусов гепатитов и антител к ним: учеб.-метод. пособие / авт. А. С. Рудницкая. — Гомель: Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», 2007. — 112с.

ISBN 978-985-506-032-2

В учебно-методическом пособии приведены основные требования и рекомендации по выполнению метода иммуноферментного анализа для выявления антигенов вирусов гепатитов и антител к ним. Предназначено для студентов медицинских университетов, а также врачей-лаборантов и лаборантов.

Утверждено и рекомендовано к изданию Центральным научным учебно-методическим советом учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет» 6 марта 2007 г., протокол № 2

ISBN 978-985-506-032-2

УДК 616.36-002:616-097

ББК 54.141+28.073

© А. С. Рудницкая, 2007
© Учреждение образования
«Гомельский государственный
медицинский университет», 2007

СОДЕРЖАНИЕ

От автора	5
Введение	6
Список сокращений	7
Глава 1. Использование метода иммуноферментного анализа для выявления вирусов гепатитов	8
Глава 2. Формы вирусного гепатита и их специфические маркеры.....	11
Глава 3. Рекомендации по организации и выполнению метода иммуноферментного анализа	26
3.1 Меры по обеспечению качества лабораторных исследований. Предупреждение внелабораторных ошибок и предупреждение внутрилабораторных ошибок	26
3.2 Рекомендации по сбору, подготовке и хранению проб	32
3.3 Основные требования, предъявляемые к тест-системам для иммуноферментного анализа	33
3.4 Перекрестные реакции и другие осложнения диагностики методом иммуноферментного анализа	36
3.5 Соблюдение правил безопасности, планировка лаборатории, правильное ведение документации	37
3.6 Правила работы с тест-системой иммуноферментной	38
3.7 Ошибки связанные с нарушением инструкции по применению тест-систем	38
3.8 Рекомендации по предупреждению ошибок, сопряженных с оборудованием и реагентами	40
3.9 Требования предъявляемые к лабораторной посуде для иммуноферментного анализа	40
3.10 Ошибки при промывке планшетов автоматическим промывателем	41
3.11 Рекомендации по использованию оборудования в лаборатории	42
3.12 Рекомендации по работе с дозаторами	42
3.13 Рекомендации по пипетированию	43
3.14 Рекомендации по работе с вошером или автоматическим промывателем планшетов	45
3.15 Контроль работы спектрофотометра	46
3.16 Рекомендации по работе с анализатором иммуноферментным АИФ–М/340	47
3.17 Перечень возможных неисправностей при работе анализатора иммуноферментного АИФ–М/340	51
3.18 Возможные ошибки на этапе учета результатов и рекомендации по их исключению	51
3.19 Препараты для дезинфекции	52
Глава 4. Организация структуры проведения иммуноферментного анализа и оформления работ проводимых для определения антигенов вирусов гепатитов и антител к ним	53
4.1 Исследование сыворотки крови человека на наличие антител класса IgM к вирусу гепатита А	53
4.2 Исследование сыворотки крови человека на наличие суммарных антител к НВс–антигену гепатита В	57

4.3 Исследование сыворотки крови человека на наличие IgM–антитела к вирусу гепатита Дельта (ИФА–анти–ВГД–М)	61
4.4 Исследование сыворотки крови человека на наличие антител к HBe–антигену вируса гепатита В	64
4.5 Исследование сыворотки крови на наличие HBe–антигена вируса гепатита В	69
4.6 Исследование сыворотки или плазмы крови на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg)	73
4.7 Исследование сыворотки крови человека для подтверждения наличия поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg)	77
4.8 Исследование сыворотки крови человека на наличие антител к ВГС (IgG)	82
4.9 Исследование сыворотки крови человека на наличие антител к вирусу гепатита С	88
4.10 Исследование сыворотки крови на наличие антител к вирусу гепатита С	93
4.11 Исследование сыворотки крови с целью идентификации спектра антител класса IgG к вирусу гепатита С и подтверждения результатов анти-HCV скрининга	96
Заключение	101
Литература	102
Приложение А	104
1. Документирование результатов иммуноферментного анализа	104
2. Протокол серологического исследования	104
3. Наименование и краткое описание тест-систем Иммуноферментных, используемых для выявления антигенов вирусов гепатита и антител к ним	105
4. Перечень тест-систем для выявления антигенов вирусов гепатита и антител к ним, зарегистрированных в системе Министерства здравоохранения РБ	108

ОТ АВТОРА

Учебно-методическое пособие «Основные рекомендации по иммуноферментному анализу при выполнении методик определения антигенов вирусов гепатитов и антител к ним» направлено на интеграцию обучения, науки и практического здравоохранения.

В учебно-методическом пособии освещены организационные и методические основы выполнения иммуноферментного анализа.

Иммуноферментный анализ основан на взаимодействии антиген-антитело. Данный метод позволяет выявить наличие вирусных антигенов или антител к ним в сыворотке крови, плазме, слюне и других жидких средах. Тест-системы для иммуноферментного анализа обладают высокой специфичностью и чувствительностью. Выявление вирусной инфекции с высокой точностью методом иммуноферментного анализа необходимо при проведении превентивных мероприятий и антивирусной терапии.

Тест-системы и наборы иммуноферментные предназначены для внешнего и внутреннего контроля качества работы лабораторий, скрининга в группах риска, специфической диагностики вирусных гепатитов, подтверждения положительных результатов на антитела к вирусам гепатитов; используются в службе переливания крови, центрах по борьбе и профилактике СПИДа, центрах гемодиализа, инфекционных больницах, центрах санитарно-эпидемиологического надзора, а также диагностических лабораториях.

Рекомендации, приведенные в учебно-методическом пособии по выполнению иммуноферментного анализа, являются результатом обобщения накопленного опыта работы при выполнении иммуноферментного анализа на базе центральной научно-исследовательской лаборатории учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет».

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов, врачей-лаборантов и лаборантов.

ВВЕДЕНИЕ

Иммуноферментный анализ широко применяют в клинической микробиологии и вирусологии. Учебно-методическое пособие «Основные рекомендации по иммуноферментному анализу при выполнении методик определения антигенов вирусов гепатитов и антител к ним» направлено на обучение иммуноферментному анализу студентов медико-диагностического факультета и для практических путей решения совершенствования последипломного медицинского образования.

Представленный в пособии материал позволяет сформировать умение системно планировать и организовывать деятельность. В пособии приведены меры по обеспечению качества лабораторных исследований; перечень тест-систем иммуноферментных для выявления антигенов вирусов гепатитов и антител к ним, в том числе зарегистрированных на территории РБ. Указаны общие ошибки выполнения иммуноферментного анализа, даны рекомендации по работе с приборами, дозаторами и пипетированию. Описан порядок выполнения отдельных методик с учетом выработанных правил, приемов диагностики и обозначен единый подход к проведению иммуноферментного анализа при выполнении методик определения вирусов гепатитов. Изложены технические вопросы работы со средствами измерений, оборудованием. В пособии отмечена краткая характеристика вирусов гепатитов и их диагностических маркеров, указаны алгоритмы специфической диагностики вирусных гепатитов. Приведены отдельные примеры по ведению документации при выполнении иммуноферментного анализа.

В издании используются материалы современной литературы, посвященные выполнению иммуноферментного анализа, и рекомендации, выработанные в результате опыта выполнения анализа сотрудниками центральной научно-исследовательской лаборатории учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЦНИЛ	— центральная научно-исследовательская лаборатория
ИФА	— иммуноферментный анализ
ВГ	— вирусные гепатиты
ВГА	— антиген вируса гепатита А культуральный
ВГВ	— вирус гепатита В
ВГС	— вирус гепатита С
БСА	— бычий сывороточный альбумин
ОК	— отрицательный контроль
ПК	— положительный контроль
НК	— нейтрализационный компонент
ОФД	— ортофенилендиамин
ТМБ	— раствор 3,3',5,5' - тетрометилбензидина
ФСТБ	— фосфатно-солевой твинсодержащий буферный раствор
СИР	— субстрат-индикаторный раствор
СБ	— субстратный буферный раствор
ФСР-Т	— фосфатно-солевой раствор с твином
АИФ	— анализатор иммуноферментный
ОП	— оптическая плотность

ГЛАВА 1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСОВ ГЕПАТИТОВ

Иммуноферментный анализ (ИФА) является одним из методов лабораторной диагностики, чувствительность и специфичность которого высока и по оценкам ряда авторов составляет более 95% у разных тест-систем и наборов.

Преимущества метода иммуноферментного анализа:

- высокочувствительный;
- специфичный;
- точный;
- воспроизводимый;
- экспресс-метод;
- стандартизован;
- не требует специальных условий;
- используются микрообъемы материала;
- отдельные иммуноферментные тест-системы изготовлены отечественными производителями и для выполнения данного метода может быть использовано как оборудование отечественного производства, так и импортного.

Метод иммуноферментного анализа основывается на двух принципиальных научных открытиях, одним из которых является способность ферментов и антител, ковалентно или нековалентно связанных с твердой основой, сохранять свою функциональную активность, то есть расщеплять субстрат (ферменты) и связывать антигены или антитела; второе открытие — это создание комплекса антитело-фермент в виде конъюгата, сохраняющего свою биологическую активность в растворе.

Выполнение твердофазного иммуноферментного анализа представляет собой ряд последовательных действий по определению антигенов вируса в исследуемых пробах либо антител к ним.

Используемые диагностические иммуноферментные тест-системы отечественного и зарубежного производства представляют собой наборы, основой которых являются рекомбинантные антигены или антитела, адсорбированные на поверхности лунок (чаще разборного) полистиролового планшета и входящие в состав конъюгата. Все наборы снабжены индивидуальными инструкциями по применению.

Разработаны и выпускаются моноклональные и поликлональные, качественные и количественные тест-системы. Различают иммуноферментный анализ прямой и конкурентный, прямого сэндвича и нейтрализации. Вариантами проведения коммерческого иммуноферментного анализа являются закрытый (например, для определения HBsAg) и открытый тип.

Метод двойного связывания представляет собой цепь реакций, где первая реакция происходит между определяемым Ig и очищенным антигеном возбудителя, фиксированным к поверхности лунок иммунологического планшета. После завершения первой реакции планшет отмывается. При этом те компоненты исследуемой пробы, которые не связались, удаляются, а на стенках лунок остается комплекс антиген-антитело. Для выявления образовавшихся иммунных комплексов проводят вторую иммунологическую реакцию, в которой в качестве антигена выступает связавшийся специфический Ig, а в качестве антител к нему — конъюгат, представляющий собой Ig (например, кроличий) к соответствующему Ig человека, меченный ферментом (обычно пероксидазой хрена). После завершения второй иммунологической реакции следует отмывка лунок планшета от избытка конъюгата и далее третий этап — ферментативная реакция, катализируемая ферментной частью молекулы конъюгата. Субстратом данной реакции служит бесцветное вещество — хромоген (орто-фенилендиамин, ОФД или тетраметилбензидин, ТМБ), который в ходе реакции образует окрашенное вещество. Интенсивность окраски в лунке определенным образом зависит от количества содержащихся в пробе Ig. После остановки ферментативной реакции проводят фотометрирование лунок. Далее с учетом значений оптической плотности контрольных проб проводят математическую обработку результатов анализа. В общем случае, чем выше оптическая плотность в данной лунке, тем большее количество специфических антител содержалось в соответствующей пробе и, следовательно, выше титр анализируемой сыворотки. При отсутствии в сыворотке исследуемых антител лунки остаются неокрашенными.

В конкурентном анализе антитела к определяемому соединению фиксированы к поверхности лунки планшета. В лунки вносится анализируемая проба и конъюгат, конкурирующий за места связывания с фиксированными антителами и имеющий в своем составе ферментативную метку. Анализ проводится в два этапа: иммунологическая реакция и ферментативная реакция. Между концентрацией анализируе-

мого вещества и оптической плотностью в лунках имеется обратная зависимость.

В конце прошлого столетия были созданы диагностические системы для определения маркеров вирусных гепатитов, антител к вирусу иммунодефицита человека, а также широкий спектр диагностических наборов для определения вирусных, бактериальных, тканевых, опухольассоциированных антигенов и антител к ним.

Для диагностики вирусного гепатита налажено серийное производство высококачественных компонентов для иммуноферментного анализа антител и конъюгатов, комплектных тест-систем для иммуноферментного анализа.

Производством тест-систем занимаются такие фирмы, как ЗАО «Вектор-Бест», НПО «Диагностические системы», «Ниармедик плюс», «Аквапаст», «Биосервис», «ИМБИО», «Biohit Plc» и другие. Отмечается, что тест-системы, выпускаемые разными изготовителями, характеризуются определенной чувствительностью при контроле качества.

Пониженная чувствительность тест-систем может стать причиной «ложноотрицательных» результатов. Другой причиной «ложноотрицательных» результатов, например, при детекции HBsAg служит изменчивость «а»-детерминанты HBsAg на распознавание которой направлены, главным образом, существующие специфичные тест-системы. Мутации s-гена ВГВ, которые затрагивают участок между 98 и 156 позициями, оказывают влияние на трехмерную структуру «а»-детерминанты препятствуют нормальной продукции HBsAg и тем самым создают предпосылки для неполного выявления.

Тест-системы иммуноферментные используют в службе переливания крови, центрах по борьбе и профилактике СПИДа, центрах гемодиализа, инфекционных больницах, центрах санитарно-эпидемиологического надзора, диагностических лабораториях.

ГЛАВА 2

ФОРМЫ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА И ИХ СПЕЦИФИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

Вирусные гепатиты представляют глобальную проблему для человечества. Среди инфекционных болезней человека гепатит А занимает по уровню заболеваемости и причиняемому экономическому ущербу одно из первых мест. Носителей вируса гепатита В в мире по данным ВОЗ более 2 млрд человек.

Еще в 1888 г. выдающийся русский врач С. П. Боткин выделил инфекционный гепатит в самостоятельную нозологическую единицу.

В 30-е годы XX века было доказано существование двух этиологически и эпидемиологически разных форм гепатита: «инфекционного» и «сывороточного». Заражение инфекционным гепатитом происходит фекально-оральным путем. Заражение в случае «сывороточного гепатита» связывали с парентеральными манипуляциями.

Ф. Мак-Каллум в 1947 г. предложил называть инфекционный гепатит гепатитом А, а сывороточный гепатит — гепатитом В. Данное предложение было узаконено ВОЗ в 1973 г.

Новая форма вирусного гепатита была выделена в 1974 г., а именно гепатит ни А ни В. В 1977 г. был обнаружен возбудитель дельта-гепатита. Сложность выявления вирусов была сопряжена с тем, что не удавалось выращивать вирусы гепатита в культурах клеток и не могли обнаружить восприимчивых к ним животных.

Таким образом, инфекционную болезнь вызывают вирусы гепатитов, которые представляют собой разнородную группу гепатотропных вирусов, принадлежащих к разным семействам и имеющих совершенно разное строение и свойства.

Вирусный гепатит А вызывает вирус гепатита А (HAV). Путь передачи — фекально-оральный. HAV открыт S. Feinstone и соавторами в 1973 г. Вирус гепатита А был обнаружен С. Фейнстоном и соавторами с помощью метода иммунной электронной микроскопии. Вирус гепатита А сферический по форме, диаметр вириона составляет 27 нм. Геном вируса представлен однонитевой позитивной РНК с м.м. 2,6 М.Д (рисунок 1). Суперкапсид отсутствует.

Тип симметрии кубический — икосаэдр. Капсид имеет 32 капсомера, который образован четырьмя полипептидами (VP1-VP4).

Вирус гепатита А отнесен по своим свойствам к роду *Heparnavirus*, семейству *Picornaviridae*. Выделено всего 7 геновариантов вируса из которых 1, 2, 3 и 7 — от людей, а 4, 5, 6 — от обезьян.

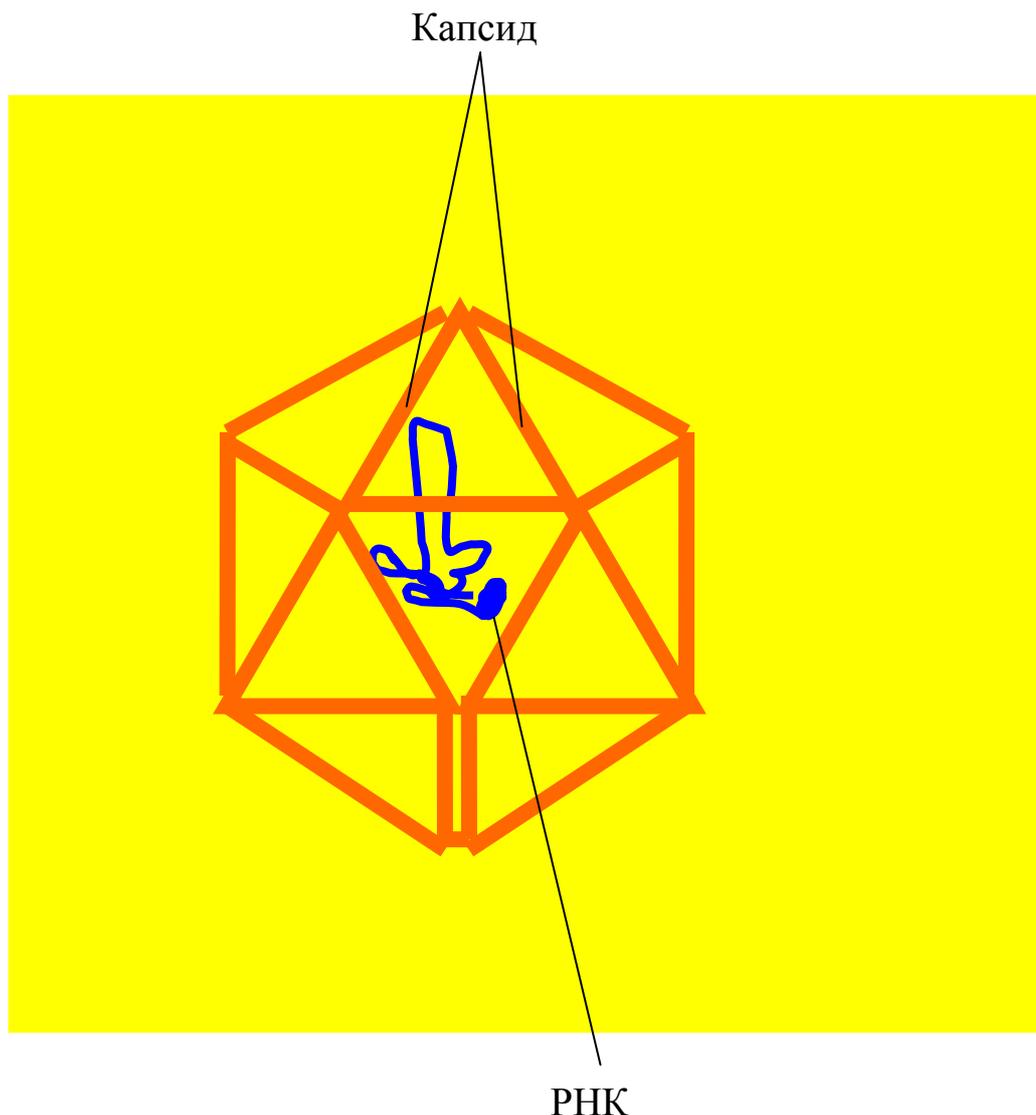


Рисунок 1 — Строение вируса гепатита А (вирус имеет однонитевую + РНК)

В антигенном отношении вирус гепатита А (HAV – hepatitis A virus) однороден, это обуславливает их принадлежность к одному серотипу, а следовательно, и моноклональный характер вырабатываемых антител.

Выявление вируса гепатита А осуществляют методом иммуноферментного анализа, а диагностическими маркерами его могут служить HAAg, анти-HAV IgM, анти-HAV IgG.

Анти-HAV IgM появляются в конце инкубационного периода, циркулируя в высоких титрах первые 4–5 недель заболевания и могут сохраняться до 4–6 месяцев. Анти-HAV IgG являются маркером перенесенного ВГА или поствакцинального иммунитета (выявляются на 1–2-й неделе заболевания с максимумом титра к 5–6-му месяцу и сохраняются практически на протяжении всей жизни). HAAg в условиях стационара является диагностически неинформативным маркером

из-за непродолжительной циркуляции в крови и редком обнаружении в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа.

При использовании тест-системы «ДИАГН-А-ГЕП», в которой на стенках полистироловых лунок сорбируются вначале антитела к иммуноглобулинам класса М (антииммуноглобулины М), вносится в лунки исследуемая сыворотка больного и в случае присутствия в сыворотке антител класса IgM они связываются анти-антителами М. Затем добавляются специфический вирусный антиген (вирус гепатита А). Систему промывают, добавляют противовирусные антитела меченные пероксидазой хрена. Если произошло взаимодействие всех четырех компонентов системы, возникает четырехслойный «сэндвич»: антииммуноглобулины М; иммуноглобулины М (против вируса гепатита А — в исследуемой сыворотке больного); вирусный антиген; противовирусные антитела (меченные ферментом). С целью обнаружения этого комплекса в лунки добавляют субстрат для фермента. Под влиянием фермента он разрушается и образуется окрашенный продукт. Определяют оптическую плотность проб с помощью спектрофотометра.

Преимущество данного метода «захвата» IgM состоит в том, что антитела класса IgM появляются при первичном иммунном ответе и свидетельствуют об активной стадии инфекции, исчезая после перенесенного заболевания. Противовирусные антитела класса IgG длительное время сохраняются после перенесенного заболевания, обеспечивая приобретенный иммунитет.

Вирус гепатита В (HBV) вызывает инфекционное заболевание гепатит В.

Первые сведения о вирусном гепатите В были получены В. Blumberg и D. Dane и соавторами, а именно антиген вируса гепатита В был обнаружен Б. Блумбергом в 1964 г. в сыворотке крови австралийского аборигена и возбудитель гепатита В был выявлен в 1970 г. Д. Дейном с соавторами и получил название частиц Дейна. В дальнейшем были обнаружены геномная ДНК и вирусная ДНК-зависимая ДНК-полимераза, что позволило с уверенностью считать частицы Дейна вирусом. В 1971 г. J. Almeida с соавторами расшифровал его структуру, показал наличие внутренней и внешней оболочек.

Вирусный гепатит В считается наиболее опасным заболеванием по своим последствиям среди всех известных форм вирусных гепатитов. Путь передачи вируса гепатита В — парентеральный.

Вирус гепатита В выделен в новое семейство — *Hepadnaviridae*, род *Orthohepadnavirus*.

Вирион состоит из трех основных антигенов, которым были присвоены следующие обозначения: HBsAg — поверхностный (superficial), или растворимый (soluble), или австралийский антиген; нуклеокапсид HBV, содержащий сердцевинный (core) антиген HBcAg, и антиген HBeAg, который представляет секретируемую растворимую часть HBcAg.

HBeAg — антиген e, локализован в сердцевине вириона и в отличие от HBcAg не только присутствует в составе вириона, но и циркулирует в свободном виде или в виде комплекса с антителом анти-HBeAg.

HBsAg существует в виде трех морфологически разных, но химически идентичных вариантах: а) в виде суперкапсида цельного вириона; б) в виде частиц диаметром 20 нм, сферической формы; в) в виде нитей длиной 230 нм. HBsAg имеет один общий антиген а и две пары взаимоисключающих типоспецифических детерминантов: d/y и w/r. Различают четыре основных субтипа HBsAg и HBV: adw, adr, auw, aug. Антиген а обеспечивает формирование общего перекрестного иммунитета ко всем субтипам вируса.

Частица Дейна имеет сферическую форму с диаметром 42 нм. Суперкапсид вириона состоит из трех белков: главного (основного S-белка, 92%), большого или длинного L-белка (1%) и среднего М-белка (4%) (рисунок 2). Геном заключен в капсид и представлен двунитевой кольцевой ДНК с м.м. 1,6 МД. ДНК состоит приблизительно из 3200 нуклеотидов. «Плюс»-нить ДНК на 20–50% короче «минус»-нити. С 5'-концом длинной нити ковалентно связан вирусспецифический белок. 5'-концы обеих нитей комплементарны и образуют «липкие» последовательности длиной в 300 нуклеотидов, благодаря чему нити замыкаются в кольцо. Содержание Г+Ц в вирионной ДНК 48–49 мол%. В сердцевине вириона находится кроме геномной ДНК вирусная ДНК-зависимая ДНК-полимераза. «Минус»-нить ДНК HBV содержит всего четыре гена (S, С, Р и Х), но они организованы очень компактно. Гены S, С, Р, Х сильно перекрываются и контролируют синтез следующих продуктов: ген S кодирует синтез главного белка оболочки и содержит всю информацию о поверхностном антигене HBsAg, кодирует синтез среднего и большого белков оболочки (белки содержат общий COOH-конец, но их трансляция начинается с трех различных инициаторных кодонов); ген С кодирует синтез капсидных белков (HBcAg и HBeAg), пути трансляции которых различны; ген Р — самый большой, включает в себя часть всех трех других генов и кодирует ферменты, необходимые для репликации вируса, в частности кодирует

обратную транскриптазу, домен фермента РНК-азы Н, 5'-концевой белок «минус»-цепи; ген Х кодирует белки, регулирующие экспрессию (выражение) всех вирусных генов, в частности белок с м.м. 17 кД, который является трансактиватором транскрипции генов.

Белки, образующие поверхностный антиген, существуют в форме гликозилированной (gr) и негликозилированной. Гликозилированными являются gr27, gr33, gr36 gr42 (цифры обозначают м.м. в кД).

Главный белок р24/gr27 является основным компонентом оболочки HBV. В отсутствие других оболочечных белков он полимеризуется и образует сферические частицы диаметром 20 нм, состоящие из 100 полипептидных молекул. Большой белок р39/gr42 присутствует во всех трех формах HBsAg.

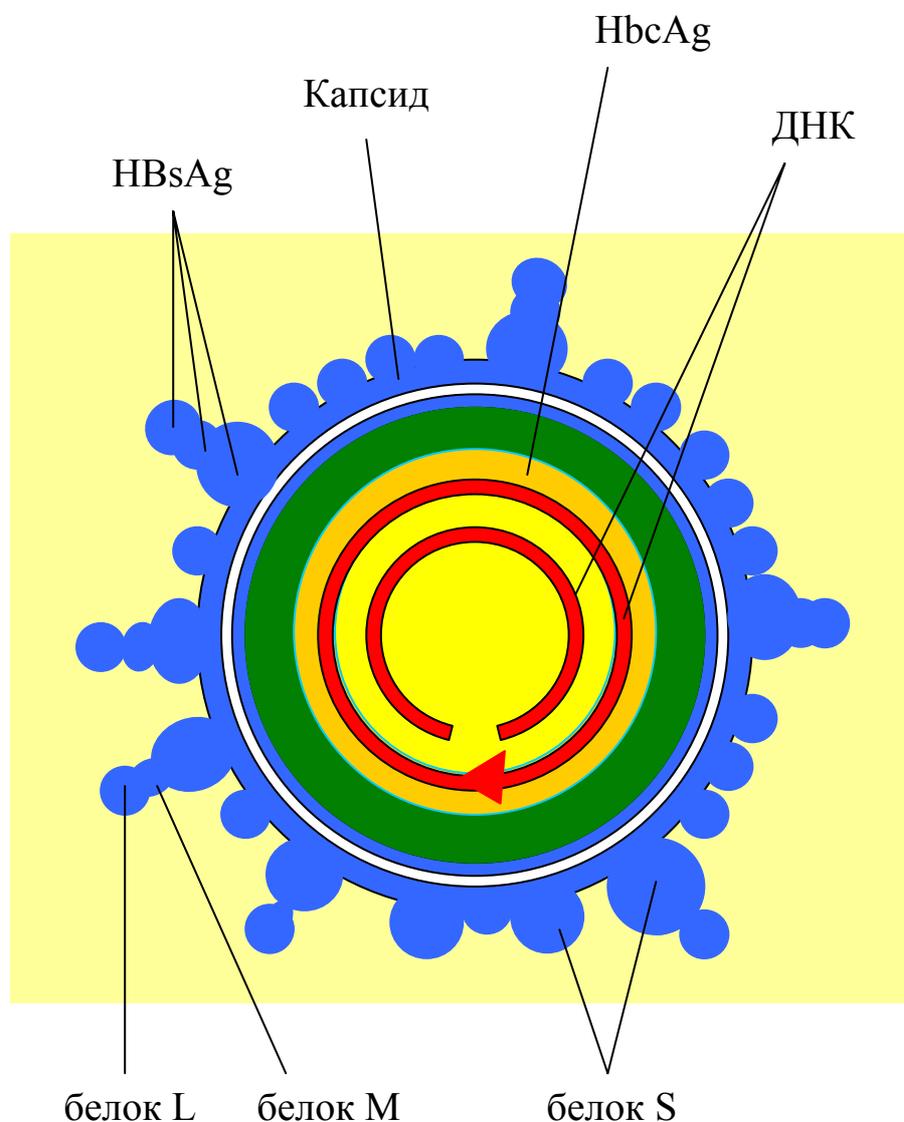


Рисунок 2 — Строение HBV (вирус с оболочкой, ДНК — двунитевой вирус)

Он играет важную роль в морфогенезе вирионов и в выходе их из клетки. Длинный белок (белок L) содержит последовательность белка M, которая на N-конце дополнена последовательностями из 108 (ayw) или 119 (adw, adr, ayr) аминокислотных остатков, кодируемых пре-S1-областью S-гена.

Средний белок gp33/gp36 присутствует во всех трех морфологических формах HBsAg. Белок M содержит на N-конце участок из 55 аминокислотных остатков, кодируемых пре-S2-областью S-гена. Последовательности белков, кодируемых пре-S-областями S-гена, обладают высокой иммуногенностью, а их детерминанты расположены на поверхности вириона.

Синтез вирусных белков жестко контролируется на уровне транскрипции и трансляции. При транскрипции вирусного генома синтезируется два типа мРНК: а) меньшая (2100 нуклеотидов) кодирует главный и средний белки оболочки; б) большая (3500 нуклеотидов, т. е. длиннее геномной ДНК), которая содержит концевые повторы длиной 100 нуклеотидов. Большая мРНК кодирует белок капсида и продукты гена Р, является матрицей для репликации вирусной ДНК. В составе генома есть энхансеры (усилители транскрипции) — регуляторные элементы, которые активируют экспрессию всех вирусных генов и действуют преимущественно в клетках печени. Ген S экспрессируется на очень высоком уровне только в клетках печени и под влиянием стероидных гормонов. Ряд регуляторных элементов вируса гепатита В модулируют (контролируют) уровни синтеза отдельных белков. Большой белок синтезируется лишь в малом количестве. Больше всего его на поверхности инфекционных вирионов. Главный белок и в несколько меньшей степени средний белок синтезируются в огромном количестве и покидают клетки в составе частиц поверхностного антигена, которых в сыворотке крови содержится во много раз больше, чем зрелых вирионов.

Поверхностный антиген может составлять 1011–1013 частиц на 1 мл крови (несколько сотен мкг).

Диагностическими маркерами HBV (в ИФА) могут служить: HBsAg, анти-HBs, HBcAg, анти-HBc IgM, анти-HBc IgG, HBeAg, анти-HBe.

Главным диагностическим маркером ВГВ является антиген наружной оболочки вируса HBsAg, который появляется в сыворотке крови при остром ВГВ через 1–2 недели после инфицирования и обнаруживается первые 4–6 недели клинического периода. На более поздних сроках у большинства больных HBsAg связывается с анти-HBs, образуя циркулирующие иммунные комплексы (причина, по ко-

торой невозможно его обнаружить). HBcAg может служить маркером HBV-репликации и вирусемии (в стационарах не определяется).

Маркером острого ВГВ являются антитела к HBcAg — анти-HBc IgM, которые обнаруживаются в начале острой фазы болезни до пика повышения активности АЛТ, до появления желтухи и даже в инкубационном периоде, что свидетельствует об активной репликации вируса. Важным является обнаружение данного маркера как единственного в фазу «окна» при наличии HBV-инфекции, т.е. после исчезновения HBsAg и до появления остальных маркеров ВГВ (анти-HBs, анти-Hbe, анти-HBc IgG). Анти-HBc IgM выявляется в сыворотке крови больных в среднем на протяжении 4–8 месяцев. Анти-HBc IgG (антитела к HBcAg, которые относятся к IgG) обнаруживаются в крови примерно в те же сроки, что и анти-HBc IgM, однако циркулируют в крови и выявляются практически пожизненно, свидетельствуя о перенесенной HBV-инфекции.

HBeAg, как указано выше, является субъединицей HBcAg. Присутствие в сыворотке крови HBeAg характеризует высокую репликативную активность HBV, а наличие антител в сыворотке крови к этому антигену свидетельствует о благоприятном течении заболевания, снижении активности вирусной репликации.

Анти-HBs — антитела к HBsAg, обнаруживаются через 3–6 месяцев после заражения, что определяется особенностью иммунного статуса больного, активностью его ответной реакции.

По наличию анти-HBs можно судить об эффективности проведенной вакцинации.

Вирус гепатита С (HCV) вызывает вирусный гепатит С. Вирусный гепатит С вызывается РНК-содержащим вирусом — HCV, который был выделен М. Houghton и соавторами в 1989 г. Возбудитель (HCV) относится к семейству Flaviviridae, передается парентеральным путем. Вирус имеет специфическую форму, содержит однонитевую линейную РНК, покрыт липидорастворимой оболочкой. Его диаметр составляет 55–65 нм. Геном представлен однонитевой нефрагментированной РНК позитивной полярности длиной 9500–10000 нуклеотидов. Образующийся при репликации вируса полипротеиновый предшественник разрезается клеточной и вирусной протеазами на белки: С (нуклеопротеин), 2 белка оболочки и 6 неструктурных белков, необходимых для регуляции репродукции вируса. Вирус отличается высокой изменчивостью всех генов. Известно до 14 геновариантов и более 50 их подтипов. Геновариант вируса определяет течение инфек-

ции, переход ее в хроническую форму и в последующем — развитие цирроза и карциномы печени. Наиболее опасны геноварианты 1b и 4a.

Его диагностические маркеры: анти-HCV IgM, анти-HCV IgG. Важным событием в вирусологии является открытие вируса гепатита С. Он идентифицирован не как вирусная частица (вирион), а как геномная (РНК) молекула, фрагмент которой удалось транслировать после клонирования ДНК-копии (кДНК). Возбудитель гепатита С распространяется среди людей почти исключительно путем абиогенной «кровяной» трансмиссии (при контакте с зараженной кровью и ее продуктами, редка, но существует вероятность контаминации плода и новорожденного инфицированными женщинами — 1–5%). Патогенетическая стратегия вируса гепатита С сводится к персистенции. Только закрепившись и поддерживая свою репликацию в организме он представляет реальную опасность. Такие методы диагностики как ИФА и ПЦР позволяют с высокой точностью выявлять HCV-инфекцию и отслеживать ее эволюцию, что составляет основу для превентивных мероприятий и антивирусной терапии.

Для вируса гепатита С характерна высокая частота мутаций, связанных с некорректируемыми ошибками репликации РНК. На основании гомологии нуклеотидных последовательностей РНК предложено дифференцировать 6 основных генотипов и более сотни субтипов (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a, 4a и др.). Генетическая изменчивость HCV проявляется и по ходу инфекции в зараженном организме, где вирус представлен популяцией близкородственных клонов с небольшими (1–2%) отличиями в структуре генома (наиболее вариабельны области генома, кодирующие оболочечные белки, прежде всего E2). Их называют «квазивиды» — *quasispecies*. Это позволяет вирусу уклоняться от эффектов иммунитета, обеспечивая расширение тканевого тропизма и повышение устойчивости к антивирусной терапии. Высокая изменчивость HCV затрудняет создание профилактической и лечебной (для ликвидации персистентной инфекции) вакцин.

Принцип лабораторной диагностики HCV-инфекции базируется на выявлении специфических серологических маркеров, что важно не только для дифференциальной диагностики гепатита С, оценки стадии заболевания и прогнозирования его течения, а также для оценки активности процесса и эффективности противовирусной терапии. Сегодня широко практикуется определение анти-HCV антител, принципиальное значение отводится генодиагностике, основанной на детекции РНК-HCV, и недавно появилась возможность обнаружения циркулирующих HCV-антигенов.

Детекция антител к каждому из HCV-антигенов имеет самостоятельное диагностическое значение. Анти-core, анти-E и анти-NS3 выявляются на самых ранних этапах сероконверсии, анти-NS4 и анти-NS5, как правило, появляются позднее. С развитием инфекционного процесса титры выявляемых анти-HCV увеличиваются.

Наличие в сыворотке анти-HCV core характеризует, т.е. является маркером вирусной репликации (коррелирует с наличием в сыворотке специфической мРНК) и может использоваться в качестве подтверждающего теста при тестировании образцов с «неопределенными» результатами. Анти-NS3 могут являться самостоятельным маркером диагностическим острой HCV-инфекции. Наличие в сыворотке крови анти-NS4 и высокие титры этих антител чаще свидетельствуют о длительности инфекционного процесса (очевидно, коррелирует со степенью поражения печени). Выявление анти-NS5 в высоких титрах часто свидетельствует о присутствии вирусной РНК, а в острой стадии является предиктом хронизации инфекционного процесса. Выявление анти-E (анти E1/E2) в течение 1 месяца от начала заболевания и быстрое последующее снижение может свидетельствовать об очищении организма от вирусной РНК, определение анти-E при хроническом гепатите С свидетельствует об активной вирусной репликации.

Следует отметить, что определение антител класса IgM к различным вирусным маркерам является важным диагностическим показателем острой или хронической инфекции (гепатит В, гепатит Д, гепатит А), однако, важность определения антител этого класса при инфекции гепатита С не вполне ясна. Получены противоречащие друг другу результаты и из этого следует, что вопреки ожиданиям IgM-ответ в острой фазе гепатита С не соответствует классическому пути антителообразования: IgM анти-HCV могут выявляться одновременно или позже, чем анти-HCV класса IgG. Обнаружение IgM анти-HCV не может быть использовано как маркер острой HCV-инфекции. Фактором, прогнозирующим персистентную инфекцию, является длительность циркуляции анти-кор-IgM (3–5 месяцев), а появление их при хроническом гепатите С свидетельствует о реактивации вируса (обострении процесса).

Проведение определения анти-HCV антител осуществляют при помощи твердофазного иммуноферментного анализа на основе комплекса структурных и неструктурных вирусных пептидов. В настоящее время применяют диагностические системы 3-го поколения (обладающие значительной чувствительностью и специфичностью), которые построены из рекомбинантных и (или) синтетических фрагмен-

тов структурных и неструктурных HCV-белков (Core, NS3, NS4 и NS5). Это позволяет сократить сроки первичного выявления анти- HCV при острой инфекции. Скрининг антител к вирусу гепатита С (HCV) широко используется для мониторинга распространенности HCV инфекции и для оценки инфекционности HCV. Лишь недавно разработаны методические подходы для иммуноферментного выявления С (кор)-белка в крови, и организовано производство первых коммерческих тест-систем («OrtoAntibody to Core Antigen (Murine Monoclonal) ELISA Test System» и «Immucheck F-HCV Ag Core Kokusu»).

При поступлении пациента в клинику проводят мероприятия, которые позволяют решить задачу по подтверждению или исключению вирусного поражения печени. Определение всего спектра маркеров в условиях стационара занимает немало времени и материально-технических затрат. У специалистов возникла необходимость разработки оптимальной схемы диагностики ВГ (выбор наиболее информативного комплекса маркеров для подтверждения диагноза, определения характера течения заболевания на каждом этапе диагностики).

Ряд специалистов на начальном этапе диагностики осуществляют подбор минимального комплекса серологических маркеров. Чаще в первичный скрининг включают определение маркеров наиболее распространенных в данной местности вирусов гепатита (например, ВГА, ВГВ и ВГС). В России циркулируют генотипы 1b, 2a, 2b и 3a. Вирус гепатита С распространен повсеместно. По данным ВОЗ, около 1% населения планеты инфицировано HCV.

HCV — один из немногих вирусов, для которых определение РНК — единственный способ идентификации.

Определение РНК вируса возможно с помощью ЦПР в варианте с обратной транскрипцией, методом ИФА антител к вирусу с использованием рекомбинантных белков и синтетических пептидов.

Алгоритм диагностики HCV-инфекции и алгоритм специфической диагностики ВГ в стационарах специалистами рекомендуется выполнять по предложенным схемам (рисунки 3 и 4).

Вирус гепатита D (HDV) вызывает инфекционное заболевание.

Вирусный гепатит D вызывается Дельта-вирусом — HDV.

Новый инфекционный агент был выявлен в 1977 г. М. Rizzetto в биоптатах печени больных хроническим ВГВ методом иммунофлюоресценции. М. Ризетто с сотрудниками назвали его дельта-антигеном.

Около 5% носителей HBV в мире инфицировано дельта-вирусом. Дельта-вирус HDV вызывает развитие тяжелой формы гепатита. Передается парентеральным путем. Его маркерами в сыворотке крови являются HDAg, анти-HDV IgM, анти-HDV IgG.



Рисунок 3 — Алгоритм диагностики HCV-инфекции



Рисунок 4 — Алгоритм специфической диагностики ВГ в стационаре

Вирус HDV представляет собой сферическую частицу, в центре которой находится антиген — HDAg, содержащий РНК.

Вирион имеет сферическую форму, его диаметр 35–37 нм. Суперкапсид дельта-вируса состоит из поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg). При разрушении вириона установлено, что его геном представлен не двунитевой ДНК, как у вируса гепатита В, а кольцевой одноцепочечной РНК с м. м. 0,5 МД. Это единственный известный вирус, геном которого представлен кольцевой РНК. В составе HDV имеется два белка, обладающих антигенной специфичностью: поверхностный — HBsAg, кодируемый геномом HBV; и внутренний белок HDAg, кодируемый геномом HDV. Внутренний белок — высокоосновной, фосфорилированный, обладает способностью взаимодействовать с РНК. Его роль состоит в формировании нуклеокапсида. Кольцевидная молекула РНК вируса дельта-гепатита напоминает вирионы. Различают три геноварианта HDV (I–III) и предполагают, что дельта-вирус является сателлитом (спутником) вируса гепатита В, т. е. дельта-вирус оказался дефектным вирусом, неспособным к самостоятельному размножению в отсутствие вируса гепатита В. Пути передачи HDV: парентерально (с кровью или ее препаратами); вертикально (от матери к плоду).

Основным методом диагностики дельта-гепатита является определение антител к нему методом иммуноферментного анализа в модификации «захват» антител — иммуноглобулинов класса М.

Вирус гепатита E (HEV) вызывает гепатит.

Вирус гепатита E открыт М. С. Балаяном в 1983 г. HEV — РНК-содержащий сферический вирус со средним диаметром частиц 27–34 нм, тип симметрии нуклеокапсида икосаэдрический, наружной оболочки нет. Геном представлен одноцепочечной нефрагментированной позитивной РНК из 7500 оснований, содержит три открытые рамки считывания, кодирующие вирусспецифические белки. На поверхности вириона имеются вдавления, напоминающие чаши (греч. Calyx), поэтому первоначально вирус был включен в семейство Caliciviridae (род *Hevirus*). Более подробное изучение генома HEV показало, что нуклеотидная последовательность его РНК уникальна и имеет лишь некоторое сходство с вирусом краснухи. Вирус близок, но не идентичен группе Caliciviridae и имеет сходство с группой Togaviridae. Возможно, что HEV представляет самостоятельный род нового таксономически еще не установленного семейства вирусов.

Маркерами HEV являются HEAg, анти-HEV IgM, анти-HEV IgG.

Механизм передачи (заражения) HEV — фекально-оральный путь. Источник инфекции — только человек, возбудитель выделяется с испражнениями. Основной путь заражения — через загрязненную испражнениями воду. Заражающая доза по сравнению с вирусом гепатита А существенно выше. Восприимчивость к вирусу HEV всеобщая. Эпидемии могут охватить десятки тысяч людей при нарушении питьевого режима, особенно во время сезонных работ летом и осенью.

Клинически болезнь протекает легче, чем гепатит А, перехода в хроническую форму не отмечено. У 85–90% больных гепатит Е протекает в легкой или средней тяжести форме, часто бессимптомно. Однако у беременных женщин гепатит Е протекает тяжело, с летальностью до 20%.

Для диагностики используют метод иммунной электронной микроскопии, а также тест-систему для обнаружения антител к антигенам HEV.

Постинфекционный иммунитет прочный, пожизненный, обусловлен вируснейтрализующими антителами и клетками иммунной памяти. Для специфической профилактики предложена цельновирионная вакцина и разрабатываются живые и рекомбинантные вакцины.

Вирус гепатита G (HGV) вызывает гепатит.

Вирус гепатита G (HGV) открыт в 1995 г., относится к семейству Flaviviridae (род *Нерасивирис*). Механизм передачи вируса — парентеральный.

Геном вируса G — одноцепочечная нефрагментированная позитивная РНК длиной около 9500 оснований. Структурная организация генома вируса G подобна таковой HCV. Геном содержит одну большую рамку считывания, которая кодирует полипротеин-предшественник, содержащий около 2800 аминокислотных остатков. Он разрезается клеточной и вирусной протеазами с образованием двух и не менее пяти неструктурных белков. Гены, кодирующие структурные белки (сog и env), прилегают к 5'-концу вирусной РНК, а гены неструктурных белков (хеликазы, протеазы, полимеразы) — к 3'-концу. Установлено, что неструктурные гены HGV сходны с генами вируса С, а также вирусов GBV-A и GBV-B. Все эти вирусы выделены в один род *Нерасивирис* семейства Flaviviridae. По строению структурных генов HGV не имеют ничего общего с GBV-A и HCV и лишь отдаленно напоминают GBV-B. Вирус гепатита G оказался идентичным вирусу GBV-C, выделенному также при изучении субпопуляции вирусов GBV от обезьян тамаринов, через которых пассировали РНК-вирус от больного острым гепатитом неустановленной этиологии, имевшего ини-

циалы GV; в честь него все эти вирусы и получили название вирусов гепатита GBV-A, GBV-B, GBV-C. Вирус HVC (GB-C) имеет дефектный core-белок и обладает менее выраженной изменчивостью, чем HCV. Выделено три типа и пять субтипов генома HGV. Доминирует генотип 2a, в том числе и на территории России, Казахстана и Киргизии. Маркеры вируса G обнаружены у 2% населения этих стран. Вирус G обнаруживается в разных странах мира у 1–2% доноров крови, т.е. чаще, чем вирус гепатита C. Подобно гепатоцитным вирусам HBV/HCV этот вирус способен к персистенции, но реже ведет к хронической патологии, и протекает эта персистенция, вероятно, по типу здорового носительства. Острые клинические проявления гепатита G также менее тяжелы, чем при гепатитах B и C.

Для диагностики гепатита G используют методы ЦПР и ИФА. Диагностический маркер его в ИФА — анти-HGV E2.

Вирус TT (TTV) вызывает вирусный гепатит.

В конце 90-х гг. XX в. у больных посттрансфузионным гепатитом неустановленной этиологии выявлен новый инфекционный агент — вирус TT (TTV). Впоследствии инфекционное заболевание было названо вирусным гепатитом TT. Механизм передачи TTV составляет два пути: парентеральный и фекально-оральный.

Место TTV в классификации еще не установлено.

Геном TTV — однонитевая молекула ДНК, состоящая не менее чем из 3739 оснований. У нее две открытые рамки считывания, способные кодировать полипептиды из 770 и 220 аминокислотных остатков.

Для данного вируса не найдены диагностические маркеры. Единственный метод диагностики TTV-инфекции — ЦПР. Применение ЦПР позволило установить широкое распространение этого вируса гепатита. По данным статистики в России антитела к TTV обнаружены у 13% здоровых доноров, у 31,3% детей, больных острым и у 17,2% хроническим гепатитом.

ГЛАВА 3

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОРГАНИЗАЦИИ И ВЫПОЛНЕНИЮ МЕТОДА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

В данной главе изложен материал по освоению единого методологического подхода выполнения ИФА, изучению ряда основных требований и рекомендаций к работе по выявлению в сыворотке крови человека антигенов вирусов гепатитов и антител к ним.

Важным при проведении иммуноферментного анализа является предупреждение ошибок как внелабораторных, так и ошибок в момент постановки анализа. К работе допускаются специалисты, изучившие инструкции по эксплуатации приборов, а также прошедшие инструктаж по ТБ на рабочем месте.

3.1. Меры по обеспечению качества лабораторных исследований. Предупреждение внелабораторных ошибок и предупреждение внутрилабораторных ошибок

Контроль качества лабораторных исследований состоит в регулярном проведении внешней оценки качества и повседневно проводимого лабораторного контроля.

Качество лабораторных исследований зависит от многих факторов и является процессом управляемым. Выделяют планирование качества (определение норм точности), обеспечение качества (на уровне системы здравоохранения РБ, на уровне предприятия-изготовителя тест-систем для ИФА, на уровне отдельного учреждения здравоохранения, на уровне отдельной диагностической лаборатории), контроль качества (внешний и внутрилабораторный).

Внешний контроль качества состоит из республиканской системы внешней оценки качества, участия в региональных и других программах внешней оценки качества, аккредитации лабораторий, аудиторской проверки. Осуществляется проверка внешнего контроля качества путем сравнения результатов, полученных в нескольких лабораториях на одном контрольном материале и тем же методом.

Аккредитация лабораторий проводится согласно закону Республики Беларусь от 5 января 2004 г. № 269-З «Об оценке соответствия требованиям технических нормативных правовых актов в области технического нормирования и стандартизации». Аккредитация осуществляется в целях подтверждения компетентности юридических лиц в выполнении работ по подтверждению соответствия и (или) про-

ведение испытаний продукции в определенной области аккредитации; а также обеспечения доверия изготовителей (продавцов) и потребителей продукции (услуг) к деятельности аккредитованных органов по сертификации и аккредитованных испытательных лабораторий (центров), создания условий для взаимного признания результатов деятельности аккредитованных органов по сертификации и аккредитованных испытательных лабораторий (центров) на международном уровне. Принципами аккредитации являются добровольность; открытость и доступность правил и процедур аккредитации; обеспечение равных условий для заявителей на аккредитацию; недопустимость ограничения конкуренции при аккредитации. Порядок осуществления аккредитации устанавливается в Системе аккредитации Республики Беларусь. Аккредитацию осуществляет Комитет по стандартизации, метрологии и сертификации при Совете Министров Республики Беларусь. Положительные результаты аккредитации удостоверяются аттестатом аккредитации, который выдается аккредитованным органам по сертификации и аккредитованным испытательным лабораториям (центрам) Комитетом по стандартизации, метрологии и сертификации при Совете Министров Республики Беларусь. Заявители на аккредитацию имеют право в установленном порядке обжаловать в суде неправомерные действия (бездействия) Комитета по стандартизации, метрологии и сертификации при Совете Министров Республики Беларусь по вопросам, связанным с прохождением процедур аккредитации. Заявители на аккредитацию обязаны выполнять требования Системы аккредитации Республики Беларусь, создавать должностным лицам Комитета по стандартизации, метрологии и сертификации при Совете Министров Республики Беларусь необходимые условия для выполнения работ по аккредитации.

Центральным органом по аккредитации накоплен значительный опыт по аккредитации лабораторий и по применению международных правил и рекомендаций.

Система устанавливает общие требования и процедуру проведения аккредитации испытательных лабораторий, осуществляющих свою деятельность в целях обеспечения надзора в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также в целях лабораторной диагностики факторов среды обитания человека.

По установленной процедуре аккредитуются организации, их испытательные лабораторные центры, испытательные лаборатории, осуществляющие санитарно-эпидемиологические исследования, ис-

питания, а также другие исследования, испытания, необходимые для реализации указанных целей.

Правила и рекомендации по аккредитации основаны на международных и отечественных документах. Это обеспечивает возможность взаимного признания с другими системами аккредитации, повышает доверие к результатам испытаний.

Система является открытой для аккредитации в ней испытательных лабораторий учреждений и организаций, расположенных как на территории Российской Федерации, так и за рубежом.

Аккредитация проводится как в отношении отдельных испытательных лабораторий, так и в составе испытательного лабораторного центра.

Целью аккредитации испытательных лабораторий в Системе является официальное признание их технической компетентности и независимости (или только технической компетентности) в заявленной области аккредитации.

Работу по аккредитации испытательных лабораторий организует и проводит Центральный орган по аккредитации лабораторий.

Решение о проведении аккредитации испытательной лаборатории (центра) принимает Центральный орган по аккредитации лабораторий.

Испытательная лаборатория может быть аккредитована на срок, не превышающий 5 лет. Конкретный срок действия Аттестата аккредитации испытательной лаборатории определяет и утверждает Центральный орган по аккредитации лабораторий.

Аккредитованная испытательная лаборатория осуществляет свою деятельность в установленной области аккредитации в соответствии с «Положением об аккредитованной испытательной лаборатории», «Руководством по качеству» и «Паспортом аккредитованной испытательной лаборатории».

Критерии, которым должна соответствовать лаборатория в соответствии с областью аккредитации, включают следующие положения:

- наличие достаточного числа специалистов, имеющих соответствующее образование, квалификацию, аттестованных в установленном порядке, в том числе экспертов;

- наличие достаточного набора помещений, соответствующих требованиям технического оснащения и применяемых методов испытаний; обеспечение требований санитарных правил и техники безопасности для проведения испытаний, исследований, включая источники энергии, освещение и окружающую среду;

- использование лабораторией методов и процедур испытаний, соответствующих области аккредитации, включая отбор образцов, обращение с ними, транспортировку, хранение и подготовку образцов к испытаниям, проведение испытаний, методы обработки и анализа результатов испытаний;

- наличие соответствующих правовых и нормативных актов; процедуры обеспечения и актуализации нормативных документов;

- наличие испытательного и вспомогательного оборудования для отбора образцов, для проведения испытаний; соблюдение требований его эксплуатации, использования, хранения, планового обслуживания, ремонта;

- обеспечение единства измерений, включая наличие необходимых средств измерений утвержденного типа, своевременность проверки средств измерений, использование аттестованных методик выполнения измерений; наличие стандартных образцов, аттестованных смесей состава (свойств) веществ и аттестованных методик их приготовления, контрольных образцовых веществ (контрольных сывороток, штаммов музейных культур и т.п.), необходимых для контроля качества санитарно-гигиенических, микробиологических, паразитологических, токсикологических исследований, соблюдение условий их хранения и сроков годности; определение точности методов и результатов измерений;

- наличие процедуры по отбору образцов, их транспортированию, регистрации и хранению образцов, обеспечивающего возможность избежать повреждений или ухудшения их характеристик, а также процедуры утилизации;

- наличие процедуры контроля качества проведения испытаний;

- наличие для определенных видов лабораторий разрешений лицензионных органов (для микробиологических лабораторий — лицензии на деятельность, связанную с использованием возбудителей инфекционных заболеваний; лицензии для лабораторий, осуществляющих работу с источниками ионизирующего излучения, и др.);

- наличие четкой и ясной процедуры регистрации процесса проведения испытаний и результатов испытаний, установленных форм регистрационных документов;

- лаборатория должна также соответствовать общим требованиям, установленным в международном стандарте ИСО/МЭК 17025: 1999 г. «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»; СТБ ИСО/МЭК 17025–2001.

Аккредитация испытательных лабораторий предусматривает следующие этапы:

- экспертиза заявки и документов, представленных испытательной лабораторией;
- формирование аттестационной комиссии по проверке испытательной лаборатории;
- оценка комиссией на месте компетентности испытательной лаборатории, включая экспериментальную проверку качества проведения испытаний;
- представление комиссией в Центральный орган по аккредитации всех материалов по аккредитации испытательной лаборатории и принятие им решения об аккредитации;
- оформление, регистрация в Реестре и выдача испытательной лаборатории аттестата аккредитации.

При нарушении требований, предъявляемых к аккредитованной испытательной лаборатории, Центральный орган по аккредитации приостанавливает или отменяет действие аттестата. Действие аттестата может быть возобновлено после устранения причин, вызвавших его приостановку. Если эти причины не устраняются в течение установленного срока, действие аттестата аккредитации отменяется.

Инспекционный контроль за деятельностью аккредитованных испытательных лабораторий проводится с целью подтверждения технической компетентности и независимости, их соответствия критериям и правилам Системы, а также для возможного одновременного проведения расширения области аккредитации.

Инспекционный контроль может быть периодическим и внеплановым: периодический контроль проводят не реже одного раза в год в течение всего срока действия аттестата аккредитации; внеплановый контроль проводят по решению Центрального органа по аккредитации в случаях, когда в межпроверочный период поступили сведения или выявлены нарушения в деятельности аккредитованной испытательной лаборатории.

Инспекционный контроль осуществляется Центральным органом по аккредитации. Результаты инспекционного контроля служат основанием для принятия Центральным органом по аккредитации решений о возможности продолжения действия, временного приостановления или отмены действия аттестата аккредитации.

Таким образом, аккредитация испытательных лабораторий (центров) в Системе аккредитации лабораторий, осуществляющих сани-

тарно-эпидемиологические исследования, испытания является квалифицированной и объективной процедурой оценки их компетентности. Результаты испытаний, полученные в лабораториях, аккредитованных в Системе, признаются для выдачи санитарно-эпидемиологических заключений, а также сертификатов соответствия без проведения дополнительных исследований.

Аккредитованные лаборатории имеют право на практическую деятельность и имеют преимущество перед не аккредитованными лабораториями по обеспечению качества исследований.

Информация по аккредитации лабораторий в Республике Беларусь предоставлена РУП «Белорусский государственный институт метрологии» (электронный адрес: info@belgim.by), а также научно-техническом центре Национального органа по аккредитации.

Аудиторские проверки осуществляются учреждениями высшей оценки качества с привлечением независимых специалистов для определения качества работ лаборатории, сравниваются применяемые методики и тщательность выполнения работ. Внутрिलाбораторные аудиты проводит руководитель лаборатории, где оцениваются лабораторные исследования по своевременности, точности, стоимости исследований, наличии слабых мест в деятельности лаборатории, составляющих угрозу появления ошибок.

Внутрिलाбораторный контроль состоит в проведении входного контроля тест-системы, контроль соблюдения инструкции по применению, исключении ошибок, связанных с оборудованием и реагентами, контроль работы оборудования, исключении ошибок при промывке планшетов и работе с дозаторами, исключении ошибок на этапе учета результатов, осуществлении оценки качества работы лаборантов.

Внутрिलाбораторный контроль качества представляет собой текущие ежедневные мероприятия (контроль постоянный и непрерывный), которые осуществляются в одной конкретной лаборатории внутри одного учреждения.

Этапами внутрिलाбораторного контроля качества являются мероприятия с целью предотвращения ошибок до их возникновения (внелабораторные ошибки) и мероприятия действенного контроля в момент постановки анализа.

Для предупреждения внелабораторных ошибок необходимо:

- соблюдение условий сбора и подготовки проб;
- соблюдение условий хранения проб;
- соблюдение условий транспортировки и хранения тест-систем;

- проведение входного контроля тест-систем: определение качества тест-систем (чувствительность, специфичность, воспроизводимость с помощью контрольных материалов), предупреждение перекрестных реакций.

Для предупреждения внутрилабораторных ошибок необходимо выполнение следующих мероприятий:

1. Правильная планировка лаборатории, соблюдение правил безопасности.

2. Правильное ведение документации.

3. Контроль соблюдения инструкции по применению тест-систем.

4. Исключение ошибок при манипуляции с тест-системами перед анализом:

- не смешивать реагенты разных серий;
- контролировать качество посуды и наконечников;
- контролировать температуру реагентов.

5. Исключение ошибок на этапе учета результатов, понятие «серой зоны».

6. Контроль работы оборудования.

7. Оценка качества работы лаборантов.

3.2. Рекомендации по сбору, подготовке и хранению проб

Источником ошибки в выполнении ИФА могут служить нарушение техники взятия крови, использование неадекватного инструментария и грязной посуды. Используемые для анализа инструменты и посуда должны быть чистыми и сухими.

Для исследования методом ИФА используется кровь из локтевой вены, полученная натощак. Забор крови у пациентов должен быть осуществлен иглами с большим диаметром, чтобы избежать повреждения эритроцитов, так как гемолиз эритроцитов ведет к ложноположительному результату. Кровь должна храниться не более 24 часов с момента забора при температуре $+2^{\circ}\dots+8^{\circ}\text{C}$. Внимание! Сыворотку крови следует отбирать после отстаивания крови при 37°C в термостате в течение не менее чем 0,5–1 часа (т.к. не перешедший в фибрин фибриноген — источник ложнопозитивных реакций). Сыворотка крови может быть отделена от эритроцитов центрифугированием (при 3000 об./мин. — 10 мин. или при 1500 об./мин. — 20 мин.). Хранить сыворотки следует при температуре $+2^{\circ}\dots+8^{\circ}\text{C}$ от 5 до 7 дней, так как более длительное хранение ведет к бактериальному проросту и лож-

ноположительному результату. При более длительном хранении сыворотки допускается ее замораживание при -20°C и хранение сроком до 20 дней, так как при более длительном хранении замораживание влияет на структуру и стабильность некоторых вирусов. Не следует замораживать и размораживать сыворотки несколько раз, так как это приводит к разрушению антигена (например, HBsAg) и антител (особенно класса M). Сыворотки не рекомендуется хранить в саморазмораживающемся холодильнике. При транспортировке используют портативный холодильник.

3.3. Основные требования, предъявляемые к тест-системам для иммуноферментного анализа

Основными показателями качества иммуноферментной тест-системы являются чувствительность, специфичность, воспроизводимость.

Чувствительность — способность тест-системы обнаружить минимальное количество искомого вещества. Чувствительность оценивается по проценту сывороток из панели заведомо положительных, т. е. содержащих антигены вирусов или антитела к ним, которые данная тест-система распознает как положительные. Низкая чувствительность обуславливает ложноотрицательный результат. Чувствительность современных тест-систем для обнаружения HBsAg 0,3–1,0 нг/мл, что составляет 3×10^5 частиц на 1 мл крови. Однако, ложноотрицательные результаты ИФА могут быть в случае забора крови у больного на ранних стадиях заболевания, когда концентрация вируса в крови ниже регистрируемой. Детекция анти-ВГС иммуноферментными тест-системами 3-го и 4-го поколения позволяют определять антитела как к структурным (Core, E2), так и не структурным (NS3, NS4, NS5) белкам ВГС, в большинстве случаев с точностью до 99,8%, исключения имеют место при обследованиях лиц с острым гепатитом С в начале заболевания, в период «окна», когда концентрация антител не достигает уровня, достаточного для определения методом иммуноферментного анализа.

Специфичность — способность тест-системы к отдифференцировке искомого вещества. Специфичность оценивается по проценту сывороток из панели заведомо отрицательных, т.е. не содержащих антигенов вирусов или антител к ним, которые данная тест-система распознает как отрицательные.

Качественная тест-система имеет высокие характеристики чувствительности и специфичности. Низкая специфичность приведет к ложноположительным результатам.

Ложноположительный результат — это положительный результат, полученный в данной тест-системе для образца, который на самом деле не содержит специфического маркера, т. е. является отрицательным.

Ложноотрицательный результат — это отрицательный результат, полученный в выбранной тест-системе для сыворотки, которая на самом деле содержит данный маркер, т. е. является положительной.

Более чувствительна та тест-система, которая дает меньше ложноотрицательных результатов, а более специфичная — та, которая дает меньше ложноположительных результатов.

Для того, чтобы результаты ИФА по специфичности не давали ложноположительных результатов рекомендуется выполнять следующие меры: повторную постановку образца в этой же иммуноферментной тест-системе; повторную детекцию в другой иммуноферментной тест-системе; использование подтверждающих тестов на основе ИФА и иммуноблота.

Воспроизводимость — это качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов определений, выполняемых в различных условиях. Воспроизводимость, т.е. способность тест-системы давать стабильный результат при многократном тестировании одного и того же образца, где воспроизводимость результата осуществляется как внутри одного планшета (при внесении исследуемого образца в разные лунки), так и при тестировании образца с использованием разных диагностических наборов (одной или разных серий). Таким образом, воспроизводимость может быть определена по результатам параллельных проб при исследовании одного образца несколькими операторами. Например, каждый лаборант ставит не менее чем в 10 повторах разведенную положительную сыворотку или одно из разведений ОСО-НВsAg. Воспроизводимость не имеет численной величины и зависит от случайных ошибок. Она является показателем стабильности качества тест-системы, чем выше данный показатель, тем надежнее тест-система.

Для определения **чувствительности и специфичности** при работе используют стандартные тест-панели, которые представляют собой подборку контрольных образцов сыворотки и плазмы крови, в которых с помощью тест-систем, международно признанных как референтные, подтверждено наличие или отсутствие искомого компонента.

Индивидуально для каждого образца приводится величина отношения ОП образца и ОП крит. (ОП обр/ОП крит) — коэффициент позитивности (КП). Проба считается позитивной, если $КП \geq 1$.

Оценка чувствительности и специфичности испытываемой тест-системы рассчитывают по формулам Р. Winkel, В.Е. Statland (1984г.).

$$\text{Чувствительность} = \frac{ИП}{ИП + ЛО} \times 100\%,$$

где *ИП* (истинно положительные результаты) — число положительных проб из тест-панели правильно распознанных испытываемой тест-системой (т.е. распознанных как положительные); *ЛО* (ложноотрицательные результаты) — число положительных проб, не распознанных испытываемой тест-системой.

$$\text{Специфичность} = \frac{ИО}{ИО + ЛП} \times 100\%,$$

где *ИО* (истинно отрицательные результаты) — число отрицательных проб из тест-панели, правильно распознанных испытываемой тест-системой (т. е. распознанных как отрицательные); *ЛП* (ложноположительные результаты) — число отрицательных проб, ошибочно распознанных испытываемой тест-системой как положительные.

Воспроизводимость тест-систем определяется в пределах одного или нескольких планшетов путем анализа не менее чем в 10 лунках пробы. Для работы можно использовать разведения ОСО HBsAg (НПО «ДС»).

Необходимо выполнить расчеты определения среднего арифметического значения ОП (*X*) из *N* параллельных проб (1) и расчет среднего квадратичного отклонения (2):

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{N}; \quad (1)$$

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X)^2}{N - 1}}, \quad (2)$$

где $(\bar{X} - X)^2$ — отклонение каждого из *N* определений от \bar{X} .

Коэффициент вариации вычисляется по формуле: $v = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100\%$

Коэффициент вариации в норме колеблется от 15 до 20%.

При оценке качества работы лаборанта различают 3 вида ошибок, искажающих результаты: грубая ошибка (при недостаточной тщательности в работе пропускается образец или вносится с другими), случайная ошибка (чаще при перекрестном загрязнении при разбрызгивании или переносе сыворотки наконечником), систематическая ошибка

(при использовании плохо откалиброванных пипеток, некачественной промывке, несоблюдении температурных и временных режимов).

Критерием качества выступает воспроизводимость. Величина σ обратно пропорциональна квалификации лаборанта.

Величина ν обратно пропорциональна квалификации лаборанта и чем меньше ν , тем лучше работает лаборант и соответственно наоборот.

Следует учитывать, что структуры вируса, вызывающие выработку антител постоянно изменяются, появляются мутантные формы с новыми антигенными детерминантами и такие мутантные формы вирусов не могут быть обнаружены в ИФА.

3.4. Перекрестные реакции и другие осложнения диагностики методом иммуноферментного анализа

Одной из причин внелабораторных ошибок являются перекрестные реакции. Часто причиной возникновения ложноположительного результата является наличие в крови пациентов неспецифических антител, перекрестно реагирующих с вирусспецифическим антигеном. Например, при выявлении HbsAg, ряд заболеваний у обследуемых пациентов (ревматизм, системные заболевания соединительной ткани, некоторые опухоли, ревматизм, а также у женщин при беременности) вызывает изменение соотношения белковых фракций крови (альбумины, глобулины, фибриноген), образуются неспецифические антитела, которые могут связываться в ИФА и давать ложноположительные результаты.

Сходную ложноположительную реакцию дают антитела в сыворотке пациентов, реагирующие с загрязняющими антигенами белками и пептидами, или даже просто с материалами планшета. Изготовителями тест-систем для предотвращения неспецифических взаимодействий создаются специальные блоки, но иногда бороться с этим явлением сложно. Следует использовать подтверждающие тесты, титровать сыворотку.

Наряду с ложноположительными возможны и ложноотрицательные результаты, например, когда HCV антитела не удается обнаружить, несмотря на присутствие вируса в организме. Известны три подобных ситуации: 1) начальный период заболевания (серонегативная фаза острого гепатита — фаза «окна»); 2) больные, получающие иммунодепрессанты (они могут быть длительно инфицированы без сероконверсии); 3) заражение некоторыми HCV-генотипами (3 и 4).

3.5. Соблюдение правил безопасности, планировка лаборатории, правильное ведение документации

При постановке иммуноферментного анализа необходимо учитывать и выполнять следующие условия:

1. Соблюдение правил и техники безопасности, правильная планировка и организация лаборатории. Помещение должно быть правильно спланировано и хорошо приспособлено, иметь достаточно освещенные специальные места для приемки образцов, их тестирования и хранения, а также подготовки документации, что поможет избежать ошибок при разборке образцов крови. Помещение для содержания образцов повышенного риска должно соответствовать правилам техники безопасности.

2. Ведение документации на должном уровне. Обеспечение нумерации каждого образца и регистрация процедур, выполняемых с образцом, оформление протоколов локализации проб на планшете (заполняется карта-схема серологического исследования, где указывается наименование тест-системы, серия, способ оценки результатов, наличие контрольного теста на качество). К протоколу должна прилагаться распечатка прибора АИФ с результатами, их анализ, а также вывод. Следует вести журнал регистрации температуры в холодильниках и термостатах, а также следить за температурой в помещении лаборатории.

3. Выполнять меры безопасности при использовании набора тест-системы:

- работу проводить в специально оборудованном помещении;
- внимательно изучить инструкцию по применению, прилагаемую к набору;
- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все сточные растворы обрабатывать 6%-ным раствором перекиси водорода (или 3%-ного монохлорамина) при комнатной температуре не менее 3 часов. Все твердые отходы собирать в специальный контейнер, автоклавировать в течение 1 часа при температуре 120°C;
- инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности протирать 70%-ным этиловым спиртом;
- наконечники обрабатывают 20%-ным раствором этилового спирта.

3.6. Правила работы с тест-системой иммуноферментной

Выполнять правила работы с тест-системой:

- не использовать набор после окончания срока годности, не смешивать компоненты наборов разных серий;
- тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа;
- использовать вымытую и сполоснутую дистиллированной водой посуду для приготовления реагентов;
- не допускать подсыхания лунок на всех этапах постановки ИФА;
- проверять точность дозирования, следить за рабочим состоянием пипеток и иного оборудования;
- избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность во время проведения анализа.

Выполнять требования к промыванию планшета:

- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов;
- для промывания планшета рекомендуется использовать автоматический промыватель — вошер; в случае отсутствия вошера или его плохой работы, в качестве исключения можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;
- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение лунок (без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок) и полную аспирацию (удаление) жидкости из них.

3.7. Ошибки, связанные с нарушением инструкции по применению тест-систем

При выполнении иммуноферментного анализа следует строго соблюдать инструкцию, прилагаемую к набору по применению тест-системы. Любое отклонение от инструкции может вызвать ошибку и оказать большое влияние на проведение анализа. Большинство ошибок совершают из-за невнимательного изучения и несоблюдения инструкции.

Наиболее часто встречающееся сознательное нарушение инструкции — сокращение времени инкубации раствора субстратной смеси с ОФД или ТМБ (растворами хромогена) в целях уменьшения количества ложноположительных результатов. Такие действия приводят к снижению чувствительности наборов, пропускаются сыворотки с низким содержанием антител или антигенов, не решаются контрольные задачи.

Увеличение продолжительности инкубации сывороток приводит к образованию ложноположительных результатов, а уменьшение снижает сигнал, ведет к понижению чувствительности.

Таким образом, не следует изменять температурный режим во время инкубации, а именно, увеличивать температуру с целью уменьшения продолжительности инкубации или изменять (без согласования с инструкцией) по собственному желанию. Также не следует увеличивать время инкубации с конъюгатом, так как это ведет к ложным результатам.

Изменение указанного в инструкции количества (мкл), числа (n) и способа промывания приводит к ложным результатам. Следует заполнять лунки до самого края (задавать программу вошера с наполнением лунок согласно инструкции).

Одно из преимуществ использования вошера для отмывки планшета заключается в создании прибором определенного давления жидкости, чего невозможно достичь при промывании с помощью пипетки 8-канальной.

Увеличение количества отмывок ведет к понижению чувствительности, а уменьшение — к ложноположительным результатам.

Не следует клеивать планшет клейкой лентой, если в инструкции написано закрыть крышкой, так как в противном случае это приводит к «пятнистому» планшету.

При работе с системами, в основе которых лежит одностадийный вариант (конъюгат добавляется одновременно с сывороткой в тест-системе, например «ИФА-НВsAg/M»), требуется очень аккуратное внесение конъюгата без заноса образцов сыворотки из ряда в ряд.

Не следует смешивать реагенты разных серий, реагенты подбираются под каждую серию.

Для разведения сывороток не использовать планшеты с сорбированным материалом.

Учет результатов и интерпретация результатов выполняется строго по инструкции.

Отрицательный результат при повторном исследовании образца позволяет считать пробу отрицательной, а положительный результат образца предполагает ее исследование в подтверждающих ИФА-тестах, иммуноблотинге или исследование методом ПЦР (полимеразной цепной реакции).

3.8. Рекомендации по предупреждению ошибок, сопряженных с недостатками в работе оборудования и реагентов

Приготовление реагентов для иммуноферментного анализа осуществляется с использованием дистиллированной или деионизированной воды.

Требования, предъявляемые к качеству дистиллированной (очищенной) воды:

1. Качество дистиллированной воды должно соответствовать ГОСТу (например, ГОСТ 6709–72 по рН — 5,4–6,6; по ФС 42–2619–97: наличие хлоридов — 2 мг/дм³, количество восстанавливающих веществ — 0,8 мг/дм³, наличие тяжелых металлов — 0,5 мг/дм³, удельная электропроводимость — не более 2,5 мкСм/м).

Перед применением у дистиллированной воды следует проверить в первую очередь рН и удельную электропроводимость, где сверхочищенная вода имеет показатель 1,3 мкСм/м; очищенная (дистиллированная) — 2–2,5 мкСм/м.

2. Не хранить дистиллированную воду более 3 дней.

3. Емкость для хранения (накопления) дистиллированной воды периодически (каждые 3 дня) мыть 3%-ной перекисью водорода.

4. Запрещено хранить дистиллированную воду в металлических емкостях.

5. Запрещено добавлять консерванты (ингибиторы пероксидазы) в емкость для хранения дистиллированной воды.

6. Перед использованием следует воду довести до комнатной температуры.

3.9. Требования, предъявляемые к лабораторной посуде для иммуноферментного анализа

Основные требования:

- лабораторная посуда должна быть химически чистой и хорошо сполоснута дистиллированной водой (исключить наличие контаминантов или неблагоприятного рН, остатков моющих средств);

- выделение отдельной посуды (ванночки, наконечники) для работы с растворами конъюгата, ТМБ, ОФД (следовые количества пероксидазы, ОФД приводят к неправильным результатам);

- не мыть посуду для ТМБ, ОФД синтетическими моющими средствами;

- споласкивать ванночки для работы с ОФД 50%-ным этиловым спиртом и дистиллированной водой;

- никогда не оставлять реагенты в резервуаре надолго, а ополаскивать по возможности немедленно после использования;
- при многократном использовании наконечников (одноразовых) рекомендуется следующая методика их обработки и мойки:
 - а) замочить в 6%-ном растворе H_2O_2 (не менее 6 часов);
 - б) промыть дистиллированной водой (не менее 2 раз);
 - в) кипятить в дистиллированной воде 5 минут, затем остудить;
 - г) промыть в дистиллированной воде (не менее 5 раз);
 - д) сушить в сушильном шкафу при $60^\circ \dots 80^\circ C$;
 - е) не трогать наконечники руками при раскладке
 - ж) хранить наконечники в стерильных пакетах.

3.10. Ошибки при промывке планшетов автоматическим промывателем

В момент выполнения промывки планшета возможно неравномерное заполнение лунок планшета, неполное удаление промывочного раствора. Некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов. Рекомендуется следить за работой автоматического промывателя (вошера) и при необходимости вызвать техника.

При неправильном использовании вошера (например, вошер не промывается после использования) может произойти бактериальный пророст в шлангах вошера. Рекомендуется ежедневно промывать систему вошера дистиллированной водой.

Возможно загрязнение каналов вошера, механические включения между иглами, а соответственно — завышение сигнала в одном из рядов или 1 лунке планшета. Рекомендуется чистить каналы мандреном.

Если наполнение промывочным раствором лунок планшета отмечается не до краев, то неверно выставлен объем в программе вошера — неспецифические реакции. Следует учитывать объем лунок разных планшетов: при 380–390 мкл выставлять объем 400 мкл, при 340–350 мкл выставить 350 мкл. Недопустимым при работе является переполнение и перетекание жидкости из соседних лунок.

Результатом сбоя в работе вошера может стать несоответствующее высушивание вакуумом. Вакуум, превышающий положенную норму, ведет к сильному подсушиванию; а недостаточный — к неполному высушиванию. Рекомендуется отрегулировать работу вошера.

3.11. Рекомендации по использованию оборудования в лаборатории

В современных лабораториях часто используется планшетный анализатор или ридер, который осуществляет все функции, необходимые для проведения ИФА (дозирование, встряхивание, инкубацию, измерение). Система интерфейсов iEMS позволяет подключить к прибору инкубатор (шейкер), промыватель (диспенсер), персональный компьютер и принтер в той комбинации, которая необходима пользователю.

В лабораториях, где нет возможности пользоваться ридером, используют приборы согласно методике ИФА. В некоторых инструкциях тест-систем рекомендуется использовать в работе шейкер инкубатор в качестве инкубатора проб с перемешиванием вместо термостата. Шейкер инкубатор — современное оборудование, предназначенное для перемешивания и инкубирования проб в 96-луночных планшетах или пробирках на этапе подготовки пробы при иммуноферментном, биохимическом и других видах анализа.

3.12. Рекомендации по работе с дозаторами

В работе используются пипетки, прошедшие метрологический контроль в установленные нормативные сроки.

Важным является проведение контроля при работе с дозатором. Дозаторы следует регулярно проверять на точность отмериваемых объемов. Калибровка гравиметрическим способом с использованием дистиллированной воды при $t=22^{\circ}\text{C}$. Вес 1 мкл дистиллированной воды равен 1 мг. Для пипеток с переменным объемом следует установить средний объем. Минимум 5 раз набирается дистиллированная вода при $t=22^{\circ}\text{C}$ и каждый раз взвешивается. Если хотя бы 1 из 5 результатов оказывается за пределами возможных отклонений, указанных в инструкции, то с помощью ключа проводится калибровка дозатора. Следует внимательно относиться к плунжеру, который может быть контаминирован. При выполнении методики ИФА важно использовать правильную технику пипетирования.

3.13. Рекомендации по пипетированию

При работе с одноканальной пипеткой необходимо выполнять следующие правила: не капать; не давить наконечником на дно лунки; не подносить наконечник под очень острым углом; убедиться в том, что наконечник касается стенки лунки и жидкости (рисунок 5).

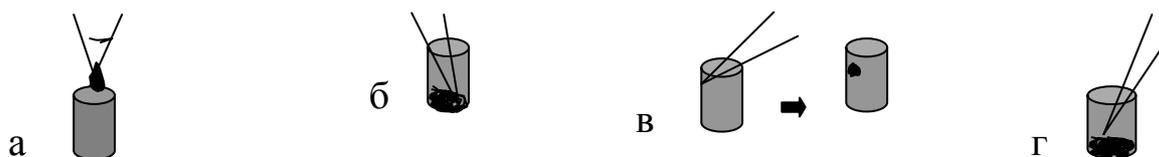


Рисунок 5 — Правила работы с одноканальной пипеткой: а) не капать; б) не давить наконечником на дно лунки; в) не подносить наконечник под очень острым углом; г) убедиться в том, что наконечник касается стенки лунки и жидкости

При работе с многоканальной пипеткой необходимо удостовериться, что все наконечники плотно насажены; проверить наличие пузырей; проверить уровень жидкости, проверить наличие заблокированных наконечников (рисунок 6).

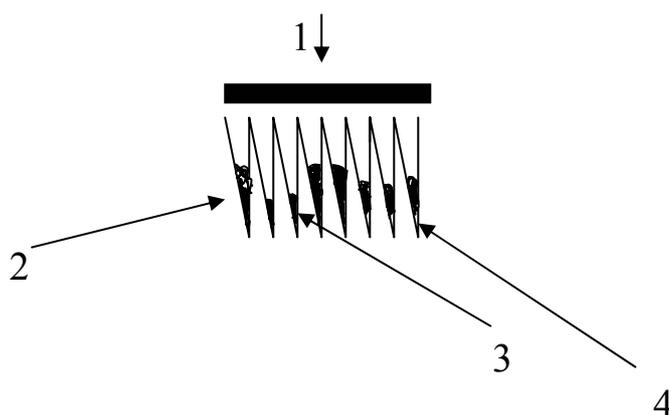


Рисунок 6 — Правила наполнения наконечников при работе с многоканальной пипеткой: 1) удостовериться, что все наконечники плотно насажены; 2) проверить наличие пузырей; 3) проверить уровень жидкости, 4) проверить наличие заблокированных наконечников

При работе используют различные способы пипетирования: поступательный; реверсивный; метод повторения; отбор проб (рисунок 7).

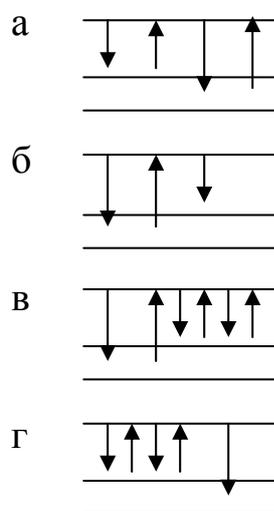


Рисунок 7 — Способы пипетирования: а) поступательный; б) реверсивный; в) метод повторения; г) отбор проб

При перемещении пипетки от планшета к резервуару необходимо держать кнопку пипетки нажатой.

Для водных растворов следует использовать прямой метод дозирования.

Для вязких или пенящихся растворов необходимо использовать обратный метод дозирования (реверсивный) (рисунок 8).

В работе используют пипетки от ультрамалых объемов до 1 мл: микропипетки с постоянным объемом, многоканальные пипетки и пипетки с переменным объемом (вари-пипетки) и порой вместо 8-канальной пипетки используют степпер.

Предупреждению загрязнения проб при работе с цифровыми пипетками способствует:

- использование U-Finn с автоклавируемым кончиком и удалителем наконечников;
- закрытый герметично поршень предупреждает и уменьшает риск физического разрушения и возможного загрязнения;
- наконечники должны быть изготовлены, как правило, из чистого полипропилена;
- инертные полимеры самой конструкции — биологически неактивны.

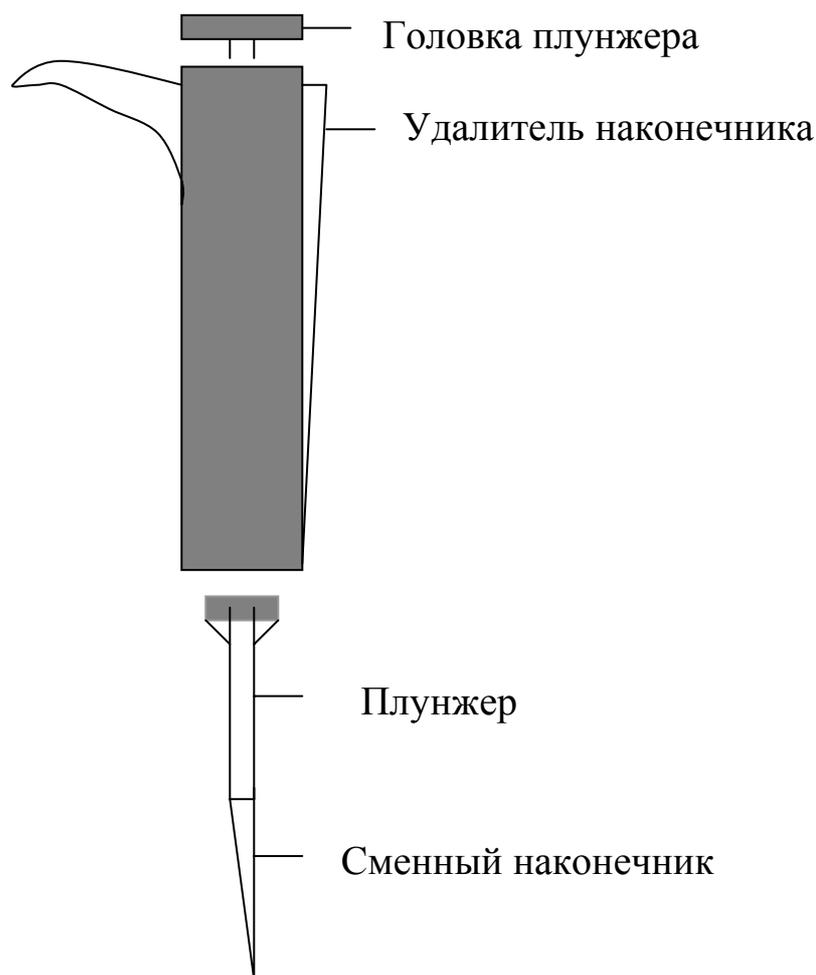


Рисунок 8 — Схема цифровой пипетки (U-Finn — пипетка для ультрамалых объемов 0,5–10 мкл)

3.14. Рекомендации по работе с вошером или автоматическим промывателем планшетов

Для отмывки планшета, в лаборатории ЦНИЛ учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет» используют автоматический промыватель планшетов МВ-350.

Прибор перед работой необходимо проверить, слить из емкости для буферного раствора дистиллированную воду (которую используют для промывки прибора) и сменить на раствор для отмывки планшета, рекомендованный по методике. Включить кнопку СЕТЬ.

Установить режим работы вошера, выбирая определенную программу в памяти прибора согласно инструкции. В случае, если пред-

лагаемый прибором режим работы не подходит, нажимают кнопку СБРОС и устанавливают вручную в память прибора необходимый режим — кнопка ВВОД.

Изменить можно такие параметры, как v (мкл) — объем, t (мин) — время экспозиции, n (цикл) — количество циклов отмывки, № (ряд) — количество рядов в планшете, которое следует отмыть. Затем устанавливают плашку в вошер и для проведения отмывки нажимают кнопку ПУСК.

По окончании работы прибор следует промыть дистиллированной водой, установив автоматический режим промывки (П). Затем прибор чистят и выключают.

3.15. Контроль над работой спектрофотометра

Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, для чего необходимо:

1. Правильное подключение прибора в сеть (исключить колебания напряжения в сети), нажать кнопку СЕТЬ.

2. Соблюдать время прогрева прибора (20–30 мин), не выключать лишний раз.

3. Использовать в текущей работе комплект приспособлений для контроля воспроизводимости планшетных анализаторов КПА–01 (изготовитель — АО ИЛИТ г. Санкт-Петербург).

4. Ежегодно проводить метрологический контроль.

Проверяемые характеристики спектрофотометра:

1. Стабильность и воспроизводимость результатов (весь диапазон).

2. Идентичность измерительных каналов.

3. Длина волны измерительного светового потока.

4. Правильность функционирования в специальных режимах.

5. Режим градуировки с помощью набора нейтральных фильтров.

В центральной научно-исследовательской лаборатории учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет» для ИФА используется АИФ–М/340. Примечательно то, что медицинским соисполнителем при разработке модели анализатора иммуноферментного фотоэлектрического (АИФ–М/340), а также АИФ Ц–01С является профессор, доктор медицинских наук С. В. Жа-воронок.

Исходя из перечня выполняемых методик в лаборатории удобно использовать для работы спектрофотометры с лучшими техническими характеристиками, в том числе с высоким спектральным разреше-

нием, спектральный диапазон 190–1100 нм, диапазон измерения спектральных коэффициентов направленного пропускания 0,1–100%, систематической погрешностью установки длины волны не более 0,3 нм, систематической погрешностью измерения спектральных коэффициентов направленного пропускания не более 1%, случайной погрешностью измерения коэффициентов направленного пропускания не более 0,5%, уровне рассеянного излучения на длинах волн 220 нм и 340 нм не более 0,05% и наличием функционального программного обеспечения, которое позволяет получить результаты в единицах оптической плотности и в единицах концентрации.

3.16. Рекомендации по работе с анализатором иммуноферментным АИФ–М/340

Анализатор иммуноферментный фотоэлектрический многоканальный АИФ–М/340 предназначен для измерения оптической плотности жидких биологических проб в планшетах для иммуноферментного анализа с обработкой результатов встроенной микро-ЭВМ и возможностью работы с IBM совместимой ПЭВМ по последовательному интерфейсу RS-232C при создании автоматизированных информационно-измерительных и диагностических комплексов.

Предусмотрена возможность подключения внешнего принтера по интерфейсу ИРПР-М (CENTRON ICS).

При работе с анализатором иммуноферментным фотоэлектрическим АИФ–М/340 в ЦНИЛ используют инструкцию к прибору, где указан перечень методик, их параметры и соответствующий им номер, который заложен и хранится в памяти анализатора.

Последовательность выполняемых шагов в работе с прибором АИФ при определении оптической плотности проб:

- проверить правильность подключения прибора в сеть, исключить колебания напряжения в сети и нажать кнопку СЕТЬ;
- соблюдать время прогрева прибора (20–30 мин.), не выключать лишний раз;
- проверить включение и работу печатающего устройства (при рабочей позиции у принтера должны быть включены (загораются) три кнопки — POWER, READY, ON LINE);
- открыть крышку и аккуратно установить планшет с исследуемыми пробами в АИФ (закрепив его зажимами на платформе);
- закрыть крышку прибора АИФ;

- в приборе АИФ–М/340 установить дату (например, 21.05.05)
- нажать кнопку ВВОД;
- на табло прибора высвечивается READY, далее нажать кнопку ВЫБОР;
- выбрать и ввести номер методики по инструкции тест-системы с учетом параметра методики согласно таблице 1 (или необходимую длину волны, например 450);
- нажать кнопку ВВОД;
- еще раз ввести номер методики согласно таблице 1 (или необходимую длину волны, например 450);
- нажать кнопку ВВОД.

Прибор АИФ–М/340 готов к работе (определению и регистрации данных).

После окончания работы удаляют планшет с исследуемым материалом, прибор выключают.

Отключение анализатора рекомендуется производить тогда, когда на индикаторе «РЕЗУЛЬТАТ» присутствует сообщение «ready».

Для отключения анализатора устанавливают сетевой выключатель «СЕТЬ», который расположен на задней панели, в положение «0».

Не допускается проводить отключение отсоединением вилки сетевого кабеля работающего анализатора из розетки.

Любая методика (таблица 1) может использоваться как для исследования с выдачей результатов в единицах оптической плотности, так и для исследований с выдачей результатов в единицах концентрации.

В случае проведения исследований с получением и выдачей результатов в единицах концентрации одновременно при измерении исследуемых проб проводится градуировка по растворам известной концентрации.

Последовательность выполняемых шагов при измерении концентрации в исследуемых пробах:

- если пустая лунка не совпадает с первым градуировочным раствором, то с помощью клавиш « A^*N » и «1.12» установить координату первого градуировочного раствора (см. инструкцию к прибору);
- нажать клавишу ВВОД.

На индикаторе «РЕЗУЛЬТАТ» высвечивается цифра, например 8, предварительно установленное число градуировочных растворов.

Таблица 1 — Параметры методик для ИФА без качественной оценки реакции

Номер методики	Длина волны*		Оценка реакции	Наличие пустой лунки, ее координаты
	рабочая	фоновая		
1	405	Нет	Нет	Нет
2	450	Нет	Нет	Нет
3	492	Нет	Нет	Нет
4	Резерв	Нет	Нет	Нет
5	Резерв	Нет	Нет	Нет
6	570	Нет	Нет	Нет
7	620	Нет	Нет	Нет
8	340	Нет	Нет	Нет
10	340	Нет	Нет	A1
11	405	Нет	Нет	A1
12	450	Нет	Нет	A1
13	492	Нет	Нет	A1
14	570	Нет	Нет	A1
15	620	Нет	Нет	A1
20	405	570	Нет	нет
21	450	620	Нет	нет
22	492	620	Нет	нет
23	405	570	Нет	A1
24	492	620	Нет	A1
25	450	620	Нет	A1

* Длина волны определяется интерференционными светофильтрами, установленными в анализатор согласно комплекту

Если количество растворов иное, то необходимо нажать цифровую клавишу с соответствующим числом градуировочных растворов, далее клавишу ВВОД; на индикаторе высвечивается сообщение «dubl.1», которое соответствует количеству лунок отводимое под каждый из градуировочных растворов (чаще — 1, но не более 5), далее нажимаем клавишу ВВОД; на индикаторе «СЕРВИС» высвечивается сообщение «dir» (направление), а на индикаторе «РЕЗУЛЬТАТ» символ «0», соответствующий вертикальному расположению градуировочных растворов, нажимаем для подтверждения, далее нажимаем клавишу ВВОД; на индикаторе высвечивается «СЕРВИС» высвечивается сообщение «SL.1» (градуировочный раствор №1), а на индикаторе результат повторно высвечивается координата первого градуировочного раствора, далее нажимаем клавишу ВВОД; на индикаторе

«РЕЗУЛЬТАТ» высвечивается предварительно установленное значение концентрации первого градуировочного раствора, а именно «0.000». С помощью цифровых клавиш наберите на индикаторе «РЕЗУЛЬТАТ» численное значение концентрации градуировочного раствора, далее нажимаем клавишу ВВОД; на индикаторе «СЕРВИС» высвечивается сообщение «SL.2» (градуировочный раствор 2), а на индикаторе «РЕЗУЛЬТАТ» высвечивается очередная, после лунок с первым градуировочным раствором, координата лунки, начиная с которой следует размещать второй градуировочный раствор, далее нажимаем клавишу ВВОД; на индикаторе «РЕЗУЛЬТАТ» высвечивается предварительно установленное значение концентрации второго градуировочного раствора. С помощью цифровых клавиш наберите на индикаторе «РЕЗУЛЬТАТ» численное значение концентрации раствора, далее нажимаем клавишу ВВОД.

Руководствуясь действиями, изложенными выше, введите численные значения концентраций для оставшихся градуировочных растворов. По окончании ввода на индикаторе «СЕРВИС» высвечивается символ «F» и набранный номер методики или численное значение длины волны, а на индикаторе «РЕЗУЛЬТАТ» сообщение «N-12», далее нажимаем клавишу ВВОД.

Индикаторы «СЕРВИС» и «РЕЗУЛЬТАТ» очищаются, и начинается режим измерения. В процессе измерения на индикаторе «РЕЗУЛЬТАТ» высвечиваются координаты лунки, измеряемой в текущий момент времени.

По окончании процесса измерения анализатор производит обработку результатов измерений, при этом на индикаторе «РЕЗУЛЬТАТ» появляется сообщение «acst» (обсчет) и происходит распечатка номера планшета, результатов измерения градуировочных растворов в единицах оптической плотности и результаты измерений исследуемых проб в единицах концентрации (на время распечатки на индикаторе «РЕЗУЛЬТАТ» выводится сообщение «print» — печать).

После окончания работы удаляют планшет с исследуемым материалом, прибор выключают. Отключение анализатора рекомендуется производить тогда, когда на индикаторе «РЕЗУЛЬТАТ» присутствует сообщение «ready». Для отключения анализатора устанавливают сетевой выключатель «СЕТЬ», расположенный на задней панели, в положение «0». Не допускается проводить отключение отсоединением вилки сетевого кабеля работающего анализатора из розетки.

3.17. Перечень возможных неисправностей при работе анализатора иммуноферментного АИФ—М/340

При работе с анализатором возможны неисправности, которые могут быть устранены самостоятельно согласно инструкции по эксплуатации.

При неисправности на панели высвечивается код сообщения, который означает:

- F01 — отсутствие заданного положения планшета;
- F02 — не погашены датчики положения планшета;
- F03 — отсутствует заданное положение модулятора;
- F04 — не погашены датчики положения модулятора;
- F05 — не подобран коэффициент усиления;
- F06 — не установлен выбранный для измерения светофильтр;
- F07 — нет запроса на прерывание от АЦП;
- F08 — не закончено преобразование АЦП;
- F09 — засветка измерительного канала;
- F10 — недостаточный сигнал при измерении на открытом канале.

При включении анализатора светится индикатор «СЕТЬ».

Чтобы устранить причину неисправности обратитесь к инструкции по эксплуатации прибора, где будет указан соответствующий способ.

3.18. Возможные ошибки на этапе учета результатов и рекомендации по их исключению

В настоящее время тест-системы иммуноферментные отечественного и зарубежного производства позволяют получить результат исследования с высокой точностью. Ранее почти в каждую тест-систему вводились границы серой зоны (сомнительный результат), а теперь практически ни в одной современной системе не вводится понятие серой зоны. Ее учитывают изготовители при создании системы и вводят коэффициент, полученный методом статистической обработки. Это соответствует требованиям ВОЗ. При желании, можно учесть погрешность работы пипеток, спектрофотометра — 15%, что вводится в границы серой зоны. Однако практика показала, что положительные сыворотки не попадают в эти границы.

При определении, например HBsAg, после добавления стоп-реагента следует проводить измерение через 2–3 минуты при использовании хромогена ОФД и через 4–5 минут — при использовании ТМБ. Если после измерения показатели некоторых лунок отличаются от cut off на 10% и менее, то планшет следует измерить еще раз. Не-

редко после второго измерения величина оптической плотности не выходит за пределы cut off.

Для расчета критической оптической плотности (cut off) большинство фирм, производящих ИФА, используют эмпирические соотношения типа $\text{Cut off} = \text{ОП (оптической плотности отрицательного контроля)} + \text{const}$, в которых постоянная принимает произвольное значение от 0,1 до 0,6. Выбирается произвольно 1–2 отрицательные сыворотки для важной задачи — определения граничного значения реактивности сыворотки при скрининге тысяч образцов.

Иногда в работе при расчете значения cut off для тестов ИФА и других количественных серологических тестов используют среднюю величину ОП сывороток неинфицированных лиц плюс удвоенное стандартное отклонение.

3.19. Препараты для дезинфекции

По окончании выполнения работы в лаборатории проводится уборка на рабочих местах с использованием дезинфицирующих средств с моющим эффектом, средств, предусмотренных для целей дезинфекции и предстерилизационной очистки изделий медицинского назначения, а также для дезинфекции поверхностей. Рабочие растворы для дезинфекции должны быть свежеприготовленными и промаркированными.

Необходимым условием при применении того или иного препарата является наличие удостоверения о государственной гигиенической регистрации на территории Республики Беларусь и методической рекомендации по применению данного препарата.

Рекомендуется использовать препараты, зарегистрированные в Республике Беларусь, например: «Инкрасепт-10А», «Инкрасепт-10В», «Инкрасепт-Т»; «СЕПТОЦИД Р ПЛЮС»; «Полидез»; «Гексадекон»; «ХЛОРМИКС»; «ДП-2Т»; «Славин», а также «Дезомикс-И»; «Дезомикс-П» и другие.

Ответственность за правильность обеззараживания, в том числе и потенциально инфекционного материала, возлагается на руководителя структурного подразделения или специально для этого назначенного врача.

Информацию о регистрации и зарегистрированных в Республике Беларусь изделий медицинского назначения и медицинской техники можно получить в Центре экспертиз и испытаний в здравоохранении (электронный адрес: <http://rceth.nsys.by/magazine/>) и БелГИСС (электронный адрес: <http://belgiss/org.by>), где также можно получить информацию по техническим нормативным правовым актам (ТНПА).

ГЛАВА 4

ОРГАНИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА И ОФОРМЛЕНИЯ РАБОТ ПРОВОДИМЫХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ВИРУСОВ ГЕПАТИТИТОВ И АНТИТЕЛ К НИМ

В данной главе учебно-методического пособия представлены методики, которые могут послужить наглядным примером для формирования умений системно планировать работу по выполнению иммуноферментного анализа, а также организовывать на высоком профессиональном уровне проведение исследований.

4.1. Исследование сыворотки крови человека на наличие антител класса IgM к вирусу гепатита А

Для определения антител класса IgM к вирусу гепатита А в сыворотке крови человека используют тест-систему иммуноферментную (enzyme immunoassay test-system for the detection IgM-antibodies to hepatitis A virus), выпускаемую отечественным производителем (приятие-изготовитель — НИИЭМ, г. Минск).

Тест-система содержит 2 потенциально опасных компонента, поэтому работа требует определенных мер предосторожности.

1. **Антиген ВГА** — инактивированный формалином культуральный антиген вируса гепатита А. Работать как с исследуемым материалом, подозрительным на зараженность вирусом гепатита А.

2. **Стоп-реагент** (используют 4-нормальную серную кислоту) не должен попадать в глаза, на слизистые и кожу. Все остальные компоненты тест-системы являются нетоксичными.

Меры предосторожности при работе с исследуемым материалом — соблюдение правил работы с возбудителями 2 группы инфекции, т. е. обязательное использование индивидуальных средств защиты: резиновых перчаток, медицинского халата, защитной марлевой повязки и очков.

Цель работы: определение антител класса IgM к вирусу гепатита А в сыворотке крови (и (или) слюне) человека.

Для работы необходимы набор тест-системы иммуноферментной для определения антител класса IgM к вирусу гепатита А (с достаточным сроком годности); средства индивидуальной защиты — халат, очки, маска, перчатки; дистиллированная вода, 6%-ная перекись водорода; 3%-ный раствор монохлорамина; 20%-ный раствор этилового спирта; 70%-ный спирт этиловый; вата гигроскопическая; фильтровальная

бумага; пипетки одноканальные (5–40, 20–200, 200–1000 мкл) и наконечники к ним; пипетки 8-канальные (50–300 мкл) и наконечники к ним; стаканы для приготовления растворов, мерный стакан и цилиндр (1000 мл); штатив; пробирки; ванночки для реагентов; флаконы для реактивов, 20 мл; суховоздушный термостат на 37°C; автоматический промыватель планшетов (вошер); фотометр (АИФ); контейнер для сбора твердых загрязненных отходов; свежеприготовленные дезинфицирующие растворы и контейнер для слива отработанных загрязненных жидкостей; карта-схема расстановки сывороток в штативе. Объект исследования — сыворотка крови и(или) слюна человека.

Ход работы

Работу выполняют с соблюдением необходимых мер предосторожности как с материалом, инфицированным вирусами гепатита.

В состав набора тест-системы входят иммуноглобулин против тяжелых цепей IgM человека (анти-IgM иммуноглобулин), бычий сывороточный альбумин (БСА), антиген вируса гепатита А культуральный (ВГА), конъюгат анти-ВГА иммунопероксидазный, отрицательный контроль (ОК), положительный контроль (ПК), раствор 3,3',5,5'-тетрометилбензидина (ТМБ), фосфатно-солевой твинсодержащий буферный раствор (ФСТБ), субстратный буферный раствор (СБ), стоп-реагент, планшет полимерный 96-луночный разборный, инструкция по применению.

Первых шесть компонентов представляют собой сухое гигроскопическое вещество кремового или белого цвета с желтовато-розовым оттенком. Рабочие дозы их герметически закрыты в стеклянных флаконах. Буферные растворы представлены прозрачными бесцветными жидкостями, которые стерилизованы ультрафильтрацией, расфасованы и герметично закрыты в стеклянных флаконах с добавлением натрия мертиолята (1:10000).

1. К выполнению работы приступают только после тщательного изучения инструкции к набору, где указано, как правильно провести подготовку исследуемых проб.

Сыворотка крови. Кровь обследуемых людей забирают в стеклянную или пластмассовую посуду в объеме 0,5–1,0 мл. Выдерживают в термостате при +37°C 30 мин, затем центрифугируют при 1000–1500 об/мин на центрифуге типа ОПН–8 в течение 30 мин. Сыворотку отсасывают и хранят при температуре минус 20°C.

Слюна. Слюну от обследованных людей забирают в стеклянную или пластмассовую посуду в объеме 0,5–1,0 мл, центрифугируют при 1000–1500 об/мин на центрифуге типа ОПН–8 в течение 30 мин. Отсасывают и хранят при минус 20°C.

2. Проведение исследования начинают с сенсibilизации твердой фазы. Анти-IgM иммуноглобулин растворяют в 3,0 мл (при поправке в инструкции — 2,5 мл) дистиллированной воды, осторожно перемешивают пипетированием и вносят по 100 мкл в каждую лунку, кроме лунки А1. Лунку А1 оставляют пустой вплоть до внесения субстрат-индикаторного раствора (СИР). Заполняют лунки, плотно заклеивают липкой лентой и инкубируют 2 часа во влажной камере при +37° С. Содержимое отсасывают и лунки отмывают 4 раза, как указано ниже.

3. Для отмывки планшета используют раствор ФСБТ, который готовят из концентрата ФСБТ путем разведения в 25 раз дистиллированной водой при тщательном перемешивании (к 8 мл ФСБТ добавляют 192 мл деионизированной воды). При выпадении солей во флаконе с ФСБТ, флакон помещают в термостат при +37°С до полного растворения солей. В каждую лунку вносят по 350 мкл полученного отмывочного раствора, выдерживают 1–1,5 мин, отсасывают содержимое и повторяют эту процедуру указанное количество раз.

4. Затем растворяют БСА (бычий сывороточный альбумин) в 2,5 мл дистиллированной воды и вносят по 100 мкл в каждую лунку планшета, плотно заклеивают липкой лентой. Инкубируют во влажной камере в течение 45 мин при температуре +37°С. Отмывают планшет 3 раза.

5. Отрицательный контроль (ОК) и положительный контроль (ПК) растворяют в 0,5 мл отмывающего раствора каждый. В первые 4 лунки вносят по 100 мкл раствора ОК, в следующие 2 лунки — по 100 мкл раствора ПК.

Исследуемые сыворотки разводят этим же отмывающим раствором в 1000 раз и вносят по 100 мкл в остальные лунки планшета (рекомендуется исследовать каждую пробу в 2-х лунках), плотно заклеивают заполненные лунки липкой лентой и инкубируют во влажной камере 2 часа при +37°С.

Исследуемую слюну разводят отмывочным раствором 1:5 и исследуют как разведенную сыворотку крови.

6. Растворяют Антиген ВГА в 2,5 мл отмывочного раствора. Вносят по 50 мкл в каждую лунку планшета, заклеивают и инкубируют во влажной камере при 16–18°С 18–20 часов. Оставшийся антиген хранят при температуре минус 20°С до следующей постановки.

7. Отмывают 4 раза раствором ФСБТ, используют вошер.

8. Конъюгат растворяют в 3,0 мл (в отдельных случаях рекомендовано растворять в 2,5 мл) отмывающего раствора. Вносят по 100 мкл в каждую лунку планшета, заклеивают и инкубируют во влажной камере 1,5 часа при 37°С.

9. Отмывают 4 раза раствором ФСБТ, используют вошер.

10. Субстрат-индикаторный раствор (СИР) готовят непосредственно перед использованием. К раствору ТМБ добавляют 1,8 мл СБ. Тщательно перемешивают и вносят в каждую лунку по 100 мкл приготовленного СИР, выдерживают 30 мин в темном месте при комнатной температуре, после чего вносят в лунки по 50 мкл стоп-реагента и учитывают результат на приборе АИФ.

Учет и интерпретация результатов ИФА.

Фотометрию проб проводят при следующих условиях: длина волны измерения — 450 нм, фоновая волна — 620 нм. Значение оптической плотности ОП в лунке А1 принимается за нулевое значение (программа Blank) или вычитается из величины ОП всех остальных лунок, если программа Blank отсутствует. В лунках с ПК значения ОП должны быть не ниже 0,6 оптической единицы (о.е.) и не менее чем в 4 раза превышать среднюю величину ОП для лунок с ОК. При этом величина ОП для ОК не должна быть более 0,15 о.е. Положительными считаются пробы, у которых ОП не ниже 0,2 о.е. и превышает среднее значение ОП для ОК в 3 раза и более.

Визуальный учет. Лунки с ОК должны быть бесцветными или слегка окрашенными. Лунки с ПК должны иметь выраженную желто-вато-коричневую окраску. Положительными считают пробы, интенсивность окраски которых приближается к окраске ПК и без сомнения выше интенсивности окраски ОК.

Вывод делают на основании полученных результатов. По предложенной схеме документирования результатов ИФА оформляют протокол, включая протокол серологического исследования.

По окончании выполнения работы производят уборку и обработку рабочих поверхностей, используя дезинфицирующие растворы (обработка поверхности столов, оборудования, посуды, пипеток), все использованные материалы подвергают обработке такими дезинфицирующими растворами как 6%-ный раствор перекиси водорода или 3%-ный раствор монохлорамина; использованные наконечники обрабатывают 20%-ным раствором этилового спирта.

Записи производят в журнале исследований и журналах по использованию оборудования в лаборатории (ЦНИЛ).

С учетом фекально-орального пути передачи вируса гепатита А, разработаны и используются для диагностики ряд других методик.

4.2 Исследование сыворотки крови человека на наличие суммарных антител к НВс-антигену гепатита В

Для выявления антител к вирусу гепатита В в сыворотке крови человека используется иммуноферментная тест-система для выявления антител к НВс-антигену вируса гепатита В, одним из производителей которой является институт им. Пастера. Обнаружение в сыворотке крови суммарных антител свидетельствует об окончании активного инфекционного процесса, санации организма и является маркером постинфекции. Выявление суммарных антител начинается с того, что в лунки с сорбированным НВс антигеном вносят смесь исследуемой сыворотки и конъюгата, представляющего собой анти-НВс, меченные ферментом — пероксидазой хрена (анти-НВс-ПХ) в стандартной концентрации. Если в исследуемых сыворотках присутствуют анти-НВс, то на поверхности лунок образуются иммунохимические комплексы следующего состава: НВс-анти-НВс. После добавления в такие лунки субстратного раствора окраска в лунках не появляется. Если в исследуемых сыворотках отсутствуют анти-НВс, то на поверхности лунок образуются иммунохимические комплексы состава: НВс-анти-НВс-ПХ, а после добавления субстратного раствора появляется окраска.

Предназначена данная методика для обследования групп повышенного риска и лиц с клиническими показателями как среди детей, так и взрослого населения, эффективна при эпидемиологических исследованиях.

Цель работы: выявить суммарные антитела к НВс-антигену (НВсAg) вируса гепатита В в сыворотке крови.

Материалы и оборудование набор тест-системы иммуноферментной для определения суммарных антител к НВс-антигену вируса гепатита В (с достаточным сроком годности); средства индивидуальной защиты — халат, очки, маска, перчатки; дистиллированная вода, 6%-ная перекись водорода; 3%-ный раствор монохлорамина; 20%-ный раствор этилового спирта; 70%-ный спирт этиловый; вата гигроскопическая; фильтровальная бумага; пипетки одноканальные (5–40, 20–200, 200–1000 мкл) и наконечники к ним; пипетки 8-канальные (50–300 мкл) и наконечники к ним; стаканы для приготовления растворов, мерный стакан и цилиндр (1000 мл); штатив; пробирки; ванночки для реагентов; флаконы для реактивов, 20 мл; суховоздушный термостат на 37°C; автоматический промыватель планшетов (вошер); фотометр (АИФ) для измерения оптической плотности в планшете; контейнер

для сбора твердых загрязненных отходов; контейнер для слива отработанных загрязненных жидкостей и свежеприготовленные дезинфицирующие растворы; карта-схема расстановки сывороток в штативе. Объект исследования — сыворотка крови человека.

Ход работы

Меры предосторожности при работе с исследуемым материалом — обязательное использование защитных марлевых повязок, резиновых перчаток, а также медицинский халат и очки.

В состав набора тест-системы входят восьмилуночные стрипы с сорбированным НВс антигеном (НВс-Аг); сыворотка, не содержащая антител к НВс-антигену вируса гепатита В, инактивированная прогреванием, (K^-), 0,65 мл (зеленый раствор); сыворотка, содержащая антитела к НВс-антигену вируса гепатита В, инактивированная прогреванием, (K^+), 0,65 мл (красный раствор); конъюгат — поликлональные анти-НВс антитела из сыворотки реконвалесцентов, меченные пероксидазой хрена (концентрат конъюгата), 0,2 мл (синий раствор); концентрат фосфатно-солевого буферного раствора, содержащий детергент — твин-80 (ФСРТ) 20,0 мл (бесцветный раствор); раствор для разведения конъюгата (РРК) бесцветный раствор, 11,0 мл; цитратный буферный раствор с перекисью водорода (ЦБП) 11,0 мл (бесцветный раствор); тетраметилбензидин (ТМБ) 2,5 мл (бесцветный раствор); раствор серной кислоты (стоп-реагент) 5,0 мл (бесцветный раствор), полиэтиленовый пакет с молнией, инструкция по применению.

I. Для проведения работы необходимо подготовить реагенты:

1. Все растворы и реагенты необходимо выдержать перед началом работы при температуре 18–25°C в течение 30 мин. Иммуноферментный анализ (ИФА) рекомендуется проводить с использованием новых, не подвергавшихся обработке наконечников для пипеток.

2. В зависимости от числа исследуемых проб отбирают необходимое количество стрипов (полосок по 8 лунок в каждой). Остальные стрипы вынимают из рамки-держателя и хранят в закрытом полиэтиленовом мешке с молнией при температуре 4–6°C.

3. Растворы каждого компонента тест-системы и каждого исследуемого образца необходимо брать с помощью индивидуального наконечника для пипеток.

4. Раствор ФСРТ. Для получения рабочего раствора содержимое флакона с концентратом ФСРТ разводят в 500 мл дистиллированной воды. Раствор хранят до 2 недель при температуре 4–6°C.

5. Раствор конъюгата. Концентрат конъюгата разводят на растворе РРК 1:41. Необходимый объем раствора конъюгата определяется числом используемых стрипов. Раствор можно сохранять до 4 ч при температуре 4–6°C.

6. Субстратный раствор. Раствор ТМБ готовят непосредственно перед использованием. Необходимый объем раствора ТМБ определяется числом используемых стрипов. Смешиваемые реагенты тщательно перемешать. При приготовлении раствора ТМБ исключить действие света (работать в защищенном от прямых лучей солнца месте). Смесь реагентов хранению не подлежит!

Посуду, наконечники пипеток, ванночки для растворов, которые контактируют с раствором ТМБ, нельзя отмывать синтетическими моющими средствами, так как даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции.

II. Проведение иммуноферментного анализа

Несмотря на то, что входящие в тест-систему контрольные сыворотки (K^+ и K^-) инактивированы, с системой следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, все использованные материалы подвергать обработке дезинфицирующими растворами (6%-ным раствором перекиси водорода или 3%-ным монохлорамина), использованные наконечники обрабатывать 20%-ным раствором этилового спирта.

Этапы выполнения иммуноферментного анализа:

1. Гидратация сорбированного НВс антигена. Во все лунки стрипов вносят по 200 мкл раствора ФСРТ. Инкубируют в течение 1–2 мин при температуре 15–20°C, затем раствор вытряхивают или удаляют насосом. Необходимо при этом придерживать стрипы в рамке-держателе.

2. Связывание анти-НВс и конъюгата. Одну из лунок (A1) оставляют незаполненной (контроль субстрата). В две лунки вносят по 50 мкл зеленого раствора K^- , в две другие — по 50 мкл красного раствора K^+ . Во все остальные лунки вносят по 50 мкл исследуемых проб. Затем во все лунки, кроме A1, вносят по 50 мкл раствора конъюгата. При внесении раствора конъюгата следует избегать прямого солнечного освещения планшета. Планшет закрывают крышкой или помещают во влажный полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 1ч при температуре $37 \pm 1^\circ C$ во влажной камере.

3. После инкубации лунки промывают 7-кратно раствором ФСРТ, а затем 1 раз дистиллированной водой.

4. Проведение ферментативной реакции. Во все лунки вносят по 100 мкл субстратного раствора. При внесении субстратного раствора следует избегать прямого солнечного освещения планшета. Планшет

закрывают крышкой и выдерживают в темноте при температуре 15–25°C в течение 15±1 мин.

5. Остановка ферментативной реакции. В лунки вносят по 50 мкл в каждую раствора стоп-реагента для остановки реакции. Учет результатов ИФА проводят не позднее 10–15 минут после внесения стоп-реагента!

III. Учет и интерпретация результатов ИФА.

При правильном проведении всех стадий анализа содержимое лунок с контролем субстрата и K^+ должно оставаться бесцветным или бледно-желтым, а содержимое лунок с K^- должно приобрести ярко-желтую окраску (описывается обратная система учета ИФА). При визуальном наблюдении исследуемый образец оценивается как положительный, если нет видимых различий в интенсивности его окрашивания по сравнению с растворами в лунках с контролем субстрата и K^+ .

Измерение оптической плотности (ОП) проводят при длине волны 450 нм непосредственно в лунках планшета с помощью фотометра. В качестве кюветы сравнения служит лунка А1 с контролем субстрата.

При правильном проведении анализа среднее значение ОП в лунках с K^- должно быть в интервале не менее 0,5 оптических единиц (о.е.), а в лунках с K^+ не должно превышать 0,25 о.е.

Оценка результатов ИФА проводится по формуле:

$$K = (\text{Среднее значение ОП для } K^-) / 3.$$

1. Если ОП исследуемой пробы меньше K , то ее исследуют повторно в дубликате и при воспроизведении аналогичного результата считают содержащей антитела к НВс-антигену вируса гепатита В.

2. Если ОП исследуемой пробы больше или равно K , то считают, что она не содержит антител к НВс-антигену вируса гепатита В.

Вывод делают на основании полученных результатов. По предложенной схеме документирования результатов ИФА оформляют протокол, включая протокол серологического исследования.

По окончании выполнения работы производят уборку и обработку рабочих поверхностей, используя дезинфицирующие растворы (обработка поверхности столов, оборудования, посуды, пипеток), все использованные материалы подвергают обработке такими дезинфицирующими растворами как 6%-ный раствор перекиси водорода или 3%-ный раствор монохлорамина; использованные наконечники обрабатывают 20%-ным раствором этилового спирта.

Записи производят в журнале исследований и журналах по использованию оборудования в лаборатории.

4.3. Исследование сыворотки крови человека на наличие IgM-антитела к вирусу гепатита Дельта (ИФА-анти-ВГД-М)

Для определения IgM-антител к вирусу гепатита Дельта используют иммуноферментную тест-систему (один из производителей — институт им. Пастера). Выявление вируса осуществляется за счет связывания антител с сорбированными синтетическими пептидами, которые соответствуют антигенным детерминантам белков, кодируемых геномом вируса гепатита Дельта. Образующиеся комплексы антиген-антитело обнаруживаются с помощью пероксидазного конъюгата на основе моноклональных антител к тяжелой цепи IgM человека по появлению окрашивания на этапе ферментативного превращения субстратного раствора.

Цель работы: определить в сыворотке крови вирус гепатита Дельта путем специфической диагностики IgM-антитела к вирусу гепатита Дельта.

Материалы и оборудование тест-система иммуноферментная для выявления IgM-антител к вирусу гепатита Дельта (ИФА-анти-ВГД-М) (с достаточным сроком годности); средства индивидуальной защиты — халат, очки, маска, перчатки; дистиллированная вода, 6%-ная перекись водорода; 3%-ный монохлорамина; 20%-ный раствор этилового спирта; 70%-ный спирт этиловый; вата гигроскопическая; фильтровальная бумага; пипетки одноканальные (5–40, 20–200, 200–1000 мкл) и наконечники к ним; пипетки 8-канальные (50–300 мкл) и наконечники к ним; стаканы для приготовления растворов, мерный стакан и цилиндр (1000 мл); штативы; пробирки; ванночки для реагентов; флаконы для реактивов, 20 мл; суховоздушный термостат на 37°C; автоматический промыватель планшетов (вошер); фотометр (АИФ) для измерения оптической плотности в планшете; контейнер для сбора твердых загрязненных отходов; контейнер для слива отработанных загрязненных жидкостей и свежеприготовленные дезинфицирующие растворы; карта-схема расстановки сывороток в штативе. Объект исследования — сыворотка крови человека.

Ход работы

Меры предосторожности при работе с исследуемым материалом обязательное использование защитных марлевых повязок, резиновых перчаток, медицинского халата и очков.

В состав набора тест-системы входят: восьмилуночные стрипы с сорбированными синтетическими пептидами, (ВГД-Аг); сыворотка, не содержащая анти-ВГД-М, инактивированная прогреванием, (К⁻), 1,2 мл (зеленый раствор); сыворотка, содержащая анти-ВГД-М, инактивиро-

ванная прогреванием, (K^+), 1,2 мл (красный раствор); конъюгат — моноклональные антитела к тяжелой цепи IgM человека, меченные пероксидазой, (концентрат конъюгата), 0,2 мл (синий раствор); цитратный буферный раствор с перекисью водорода, (ЦБП) 12,0 мл (бесцветный раствор); тетраметилбензидин (ТМБ), 2,5 мл (бесцветный раствор); концентрат фосфатно-солевого раствора, содержащий детергент — твин-80, (ФСРТ), 20,0 мл (бесцветный раствор); раствор для исследуемых проб (РИП), 10,0 мл (синий раствор); раствор для разведения конъюгата (РРК), 11,0 мл (бесцветный раствор); раствор серной кислоты, (стоп-реагент), 5,0 мл (бесцветный раствор); полиэтиленовый пакет с молнией; инструкция по применению.

I. Для проведения работы необходимо подготовить реагенты:

1. Все растворы и реагенты необходимо выдержать перед началом работы при температуре 18–25°C в течение 30 мин. Иммуноферментный анализ рекомендуется проводить с использованием новых, не подвергавшихся обработке наконечников для пипеток.

2. В зависимости от числа исследуемых проб отбирают необходимое количество стрипов (полосок по 8 лунок в каждой). Остальные стрипы вынимают из рамки-держателя и хранят в закрытом полиэтиленовом мешке с молнией при температуре 4–6°C.

3. Растворы каждого компонента тест-системы и каждого исследуемого образца необходимо брать с помощью индивидуального наконечника для пипеток.

4. Раствор ФСРТ. Для получения рабочего раствора содержимое флакона с концентратом ФСРТ разводят в 500 мл дистиллированной воды. Раствор хранят до 2 недель при температуре 4–6°C.

5. Раствор конъюгата. Концентрат конъюгата разводят на растворе РРК 1:80. Необходимый объем раствора конъюгата определяется числом используемых стрипов. Раствор можно сохранять до 4 ч при температуре 4–6°C.

6. Субстратный раствор. Раствор ТМБ готовят непосредственно перед использованием. Необходимый объем раствора ТМБ определяется числом используемых стрипов. Смешиваемые реагенты тщательно перемешать. При приготовлении раствора ТМБ исключить действие света (работать в защищенном от прямых лучей солнца месте). Смесь реагентов хранению не подлежит!

Посуду, наконечники пипеток, ванночки для растворов, которые контактируют с раствором ТМБ, нельзя отмывать синтетическими моющими средствами, так как даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции.

II. Проведение иммуноферментного анализа.

В лунки с сорбированными синтетическими пептидами, которые соответствуют антигенным детерминантам белков, кодируемых геномом вируса гепатита Дельта при добавлении сыворотки крови, потенциально содержащей IgM-антитела к вирусу гепатита Дельта, образуются комплексы антиген-антитело, которые обнаруживаются с помощью пероксидазного конъюгата на основе моноклональных антител к тяжелой цепи IgM человека по появлению окрашивания на этапе ферментативного превращения субстратного раствора.

Этапы выполнения иммуноферментного анализа:

а) Гидратация сорбированных пептидов. Во все лунки стрипов вносят по 200 мкл раствора ФСРТ. Инкубируют в течение 1–2 мин при температуре 18–25°C, затем раствор вытряхивают или удаляют насосом. Осторожно, стрипы! Они могут выпадать из рамки держателя.

б) Связывание антител. Одну из лунок (A1) оставляют незаполненной (контроль субстрата). В две лунки вносят по 100 мкл красного раствора K⁺, в следующие две лунки — по 100 мкл зеленого раствора K⁻, во все остальные лунки вносят по 90 мкл синего раствора РИП. В лунки с синим раствором РИП вносят по 10 мкл исследуемых проб, тщательно (не менее 3 раз) перемешивая пипетированием. При этом цвет раствора меняется от синего до изумрудного. Планшет закрывают крышкой или помещают во влажный полиэтиленовый пакет и инкубируют при температуре 37±1°C в течение 30±1 мин во влажной камере.

После инкубации лунки промывают 5-кратно раствором ФСРТ.

в) Связывание конъюгата.

Во все лунки, кроме A1, вносят по 100 мкл раствора конъюгата. При внесении раствора конъюгата следует избегать прямого солнечного освещения планшета. Планшет закрывают крышкой или помещают во влажный полиэтиленовый пакет и инкубируют при температуре 37±1°C в течение 30±1 мин во влажной камере.

После инкубации лунки промывают 5-кратно раствором ФСРТ, а затем 1 раз дистиллированной водой.

г) Проведение ферментативной реакции. Во все лунки вносят по 100 мкл субстратного раствора. При внесении субстратного раствора следует избегать прямого солнечного освещения планшета. Планшет закрывают крышкой и выдерживают в темноте при температуре 18–25°C в течение 15±1 мин.

д) Остановка ферментативной реакции. Реакцию останавливают внесением в каждую лунку по 50 мкл раствора стоп-реагента. Учет результатов проводят не позднее 10–15 минут после внесения стоп-реагента!

III. Учет результатов:

Учет и интерпретация результатов ИФА. Содержимое лунок с контролем субстрата и K^- должно оставаться бесцветным или бледно-желтым, а содержимое лунок с K^+ должно приобрести ярко-желтую окраску. При визуальной оценке положительные пробы отчетливо различаются по интенсивности окрашивания при сравнении их с растворами в лунках контроля субстрата и K^- .

Измерение оптической плотности (ОП) проводят при длине волны 450 нм непосредственно в лунках планшета с помощью вертикального фотометра. В качестве кюветы сравнения служит лунка А1 с контролем субстрата.

При правильном проведении анализа среднее значение ОП в лунках с K^- не должно превышать 0,15 оптических единиц (о.е.), а в лунках с K^+ быть в интервале (0,9–1,5) о.е.

Оценка результатов ИФА проводится по формуле:

$$K = 0,2 + \text{Среднее значение ОП для } K^-.$$

1. Если ОП исследуемой пробы больше K , то ее исследуют повторно в дубликате и при воспроизведении аналогичного результата считают содержащей IgM-антитела к вирусу гепатита Дельта.

2. Если ОП исследуемой пробы меньше или равно K , то считают, что она не содержит IgM-антител к вирусу гепатита Дельта.

Вывод делают на основании полученных результатов. По предложенной схеме документирования результатов ИФА оформляют протокол, включая протокол серологического исследования.

По окончании выполнения работы производят уборку и обработку рабочих поверхностей, используя дезинфицирующие растворы (обработка поверхности столов, оборудования, посуды, пипеток), все использованные материалы подвергают обработке такими дезинфицирующими растворами как 6%-ный раствор перекиси водорода или 3%-ный раствор монохлорамина; использованные наконечники обрабатывают 20%-ным раствором этилового спирта.

Записи производят в журнале исследований и журналах по использованию оборудования в лаборатории.

4.4. Исследование сыворотки крови человека на наличие антител к HBe-антигену вируса гепатита В

Исследование направлено на определение суммарных антител к HBe-антигену вируса гепатита В в сыворотке крови человека, где используют тест-систему иммуноферментную для выявления антител к

НВе-антигену HBV (ИФА-анти-НВе/HEPAVIR-B (anti-НВе) производитель — институт им. Пастера). После сорбции в лунках стрипов антител к НВе-антигену вируса гепатита В (анти-НВе) в лунки вносят смесь исследуемой сыворотки и НВе-антиген вируса гепатита В (НВе) в стандартной концентрации. Если в сыворотках пациентов присутствуют анти-НВе, на поверхности лунок образуются иммунохимические комплексы следующего состава: анти-НВе – НВе-анти-НВе. После добавления в такие лунки конъюгата, представляющего собой анти-НВе, меченные ферментом — пероксидазой хрена (анти-НВе-ПХ), а затем субстратного раствора — окраска в лунках не появляется. Если в исследуемых сыворотках отсутствуют анти-НВе, то на поверхности лунок образуются иммунохимические комплексы состава:

- анти-НВе-НВе, а после добавления конъюгата-состава;
- анти-НВе-НВе-анти-НВе-ПХ. Именно в таких лунках после добавления субстратного раствора появляется окрашивание.

Методику используют с целью контроля специфического лечения, а также для определения исходов и тяжести течения острого и хронического гепатита В.

Цель работы: обнаружение суммарных антител к НВе-антигену вируса гепатита В.

Для работы необходимы набор тест-системы для определения антител к НВе-антигену вируса гепатита В (с достаточным сроком годности); средства индивидуальной защиты — халат, очки, маска, перчатки; дистиллированная вода, 6%-ная перекись водорода; 3%-ный раствор монохлорамина; 20%-ный раствор этилового спирта; 70%-ный спирт этиловый; вата гигроскопическая; фильтровальная бумага; пипетки одноканальные (5–40, 20–200, 200–1000 мкл) и наконечники к ним; пипетки 8-канальные (50–300 мкл) и наконечники к ним; стаканы для приготовления растворов, мерный стакан и цилиндр (1000 мл); штативы; пробирки; ванночки для реагентов; флаконы для реактивов, 20 мл; суховоздушный термостат на 37°C; автоматический промыватель планшетов (вошер); фотометр (АИФ) для измерения оптической плотности в планшете; контейнер для сбора твердых загрязненных отходов; контейнер для слива отработанных загрязненных жидкостей и свежеприготовленные дезинфицирующие растворы; карта-схема расстановки сывороток в штативе. Объект исследования — сыворотка крови человека.

Ход работы

Несмотря на то, что входящие в тест-систему контрольные сыворотки K^+ и K^- инактивированы, с системой следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом.

В состав набора тест-системы входят восьмилуночные стрипы; концентрат антител к HBe антигену для сорбции (концентрат анти-HBe) (бесцветный раствор); концентрат HBe-антигена вируса гепатита В (HBe-Ag) (малиновый раствор); сыворотка, не содержащая антител к HBe-антигену вируса гепатита В, инактивированная прогреванием (K^-) (зеленый раствор); сыворотка, содержащая антитела к HBe-антигену вируса гепатита В, инактивированная прогреванием (K^+) (красный раствор); конъюгат — поликлональные антитела к сыворотке, не содержащей антител к HBe-антигену из сыворотки реконвалесцентов, меченные пероксидазой хрена (концентрат конъюгата) (синий раствор); концентрат фосфатно-солевого буферного раствора, содержащий детергент — твин-80 (ФСРТ) (бесцветный раствор); цитратный буферный раствор с перекисью водорода (ЦБП) (бесцветный раствор); раствор для разведения конъюгата (РРК) (бесцветный раствор); физиологический раствор (ФР) (голубой раствор); тетраметилбензидин (ТМБ) (бесцветный раствор); раствор серной кислоты (стоп-реагент) (бесцветный раствор); полиэтиленовый пакет с молнией; инструкция по применению.

I. Для проведения работы необходимо подготовить реагенты.

Перед применением все реагенты необходимо выдержать при температуре 18–25°C в течение 30 мин. Иммуноферментный анализ рекомендуется проводить с использованием новых, не подвергавшихся обработке наконечников для пипеток.

В зависимости от числа исследуемых проб отбирают необходимое количество стрипов (полосок по 8 лунок в каждой). Остальные стрипы вынимают из рамки-держателя и хранят в закрытом полиэтиленовом мешке.

Растворы каждого компонента тест-системы и каждого исследуемого образца необходимо брать с помощью индивидуального наконечника для пипеток.

Раствор ФСРТ. Для получения рабочего раствора содержимое флакона с концентратом ФСРТ разводят в 500 мл дистиллированной воды. Раствор хранят до 5 дней при температуре 4–6°C.

Раствор анти-HBe для сорбции. Для получения рабочего раствора анти-HBe для сорбции концентрат анти-HBe разводят 1:20 на растворе ФР. Необходимый объем раствора анти-HBe определяется числом используемых стрипов. Хранят до 4 ч при температуре 4–6°C.

Раствор анти-HBe антигена. Для получения рабочего раствора HBe антигена содержимое пробирки с концентратом HBe-Ag разводят

1:10 на растворе ФСРТ. Необходимый объем раствора HBe-Ag определяется числом используемых стрипов. Хранят при температуре 4–6°C.

Раствор конъюгата. Концентрат конъюгата разводят на растворе РРК 1:20. Необходимый объем раствора конъюгата определяется числом используемых стрипов. Хранят до 4 ч при температуре 4–6°C.

Субстратный раствор. Раствор ТМБ готовят непосредственно перед использованием. Необходимый объем раствора ТМБ определяется числом используемых стрипов. Смешиваемые реагенты тщательно перемешать. При приготовлении раствора ТМБ исключить действие света. Смесь реагентов хранению не подлежит!

Посуду, наконечники пипеток, ванночки для растворов, которые контактируют с раствором ТМБ, нельзя отмывать синтетическими моющими средствами, так как даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции.

II. Проведение иммуноферментного анализа

1. Сорбция анти-HBe. Во все лунки стрипов вносят по 100 мкл голубого раствора анти-HBe. Планшет закрывают крышкой или помещают во влажный полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 12–24 ч при температуре 18–25°C. Затем раствор из лунок вытряхивают или удаляют насосом и промывают 2 раза раствором ФСРТ, внося в каждую лунку по 200 мкл раствора с последующим удалением.

2. Связывание HBe и анти-HBe. Одну из лунок (A1) оставляют незаполненной (контроль субстрата). Во все остальные лунки вносят по 50 мкл красного раствора HBe. Затем в две лунки вносят по 50 мкл зеленого раствора K^- , в следующие две — по 50 мкл красного раствора K^+ . Во все остальные лунки вносят по 50 мкл исследуемых проб, тщательно (не менее 3-х раз) перемешивая пипетированием. Планшет закрывают крышкой или помещают во влажный полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 12–24 ч при температуре 18–25°C.

После инкубации лунки промывают 5-кратно раствором ФСРТ.

3. Связывание конъюгата.

Во все лунки, кроме A1, вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. При внесении раствора конъюгата следует избегать прямого солнечного освещения планшета. Планшет закрывают крышкой или помещают во влажный полиэтиленовый пакет и инкубируют при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 2 ч во влажной камере.

4. Проведение ферментативной реакции. Во все лунки вносят по 100 мкл субстратного раствора. При внесении раствора конъюгата следует избегать прямого солнечного освещения планшета. Планшет

закрывают крышкой или перемещают во влажный полиэтиленовый пакет и инкубируют при температуре 18–25°C в течение 15±1 мин.

5. Остановка ферментативной реакции. Реакцию останавливают внесением в каждую лунку по 50 мкл раствора стоп-реагента. Учет результатов проводят не позднее 10–15 минут после внесения стоп-реагента!

III. Учет результатов.

Учет и интерпретация результатов ИФА. Содержимое лунок с контролем субстрата и K^+ должно оставаться бесцветным или бледно-желтым, а содержимое лунок с K^- должно приобрести ярко-желтую окраску. Исследуемый образец оценивается как положительный в том случае, если нет видимых различий в интенсивности его окрашивания по сравнению с растворами в лунках с контролем субстрата и K^+ .

Учет результатов, измерение оптической плотности (ОП) проводят при длине волны 450 нм непосредственно в лунках планшета спектрофотометрически на плащечном фотометре. В качестве кюветы сравнения служит лунка А1 с контролем субстрата. При правильном проведении анализа среднее значение ОП в лунках с K^- должно быть в интервале 0,8–2,0 оптических единиц, а в лунках с K^+ не должно превышать 0,3 о.е.

Оценка результатов ИФА проводится по формуле:

$$K = (\text{среднее значение ОП для } K^-) / 4.$$

1. Если ОП исследуемой пробы меньше K , то ее исследуют повторно в дубликате и при воспроизведении аналогично результата считают содержащей антитела к HBe-антигену вируса гепатита В.

2. Если ОП исследуемой пробы больше или равно K , то считают, что она не содержит антител к HBe-антигену вируса гепатита В.

Вывод делают на основании полученных результатов. По предложенной схеме документирования результатов ИФА оформляют протокол, включая протокол серологического исследования.

По окончании выполнения работы производят уборку и обработку рабочих поверхностей, используя дезинфицирующие растворы (обработка поверхности столов, оборудования, посуды, пипеток), все использованные материалы подвергают обработке такими дезинфицирующими растворами как 6%-ный раствор перекиси водорода или 3%-ный раствор монохлорамина; использованные наконечники обрабатывают 20%-ным раствором этилового спирта.

Записи производят в журнале исследований и журналах по использованию оборудования в лаборатории.

4.5. Исследование сыворотки крови на наличие HBe-антигена вируса гепатита В

Для выявления HBe-антигена вируса гепатита В в сыворотке крови человека используют методику с применением тест-системы иммуноферментной (например, выпускаемую институтом им. Пастера), которая основана на принципе связывания данного антигена гепатита В со специфическими антителами, сорбированными на поверхности лунок. Образующийся комплекс антитело-антиген выявляется с помощью пероксидазного конъюгата на основе поликлональных антител к HBe-антигену по появлению окрашивания на этапе ферментативного превращения субстратного раствора.

Методика эффективна, ее используют при контроле специфического лечения и для определения исходов и тяжести течения острого и хронического гепатита В, а также при выявлении наиболее контагиозных вирусоносителей в семейных очагах, у беременных и в контингентах риска при эпидемиологических исследованиях.

Цель работы: обнаружение HBe-антигена вируса гепатита В в сыворотке крови человека.

Для работы необходимы набор тест-системы иммуноферментной для выявления HBe-антигена вируса гепатита В (ИФА-HBe-антиген / НЕРАVIR-В (Hbe-Ag)) (с достаточном сроком годности); средства индивидуальной защиты — халат, очки, маска, перчатки; дистиллированная вода, 6%-ная перекись водорода; 3%-ный раствор монохлорамина; 20%-ный раствор этилового спирта; 70%-ный спирт этиловый; вата гигроскопическая; фильтровальная бумага; пипетки одноканальные (5–40, 20–200, 200–1000 мкл) и наконечники к ним; пипетки 8-канальные (50—300 мкл) и наконечники к ним; стаканы для приготовления растворов, мерный стакан и цилиндр (1000 мл); штатив; пробирки; ванночки для реагентов; флаконы для реактивов, 20 мл; суховоздушный термостат на 37°C; автоматический промыватель планшетов (вошер); фотометр (АИФ) для измерения оптической плотности в планшете; контейнер для сбора твердых загрязненных отходов; контейнер для слива отработанных загрязненных жидкостей и свежеприготовленные дезинфицирующие растворы; карта-схема расстановки сывороток в штативе. Объект исследования — сыворотка крови человека.

Ход работы

Несмотря на то, что входящие в тест-систему контрольные сыворотки (K+ и K-) инактивированы, с системой следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом.

В состав набора тест-системы входят восьмилуночные стрипы; концентрат антител к НВе антигену для сорбции (концентрат анти-НВе) (бесцветный раствор); концентрат НВе-антигена вируса гепатита В, инактивированный прогреванием (K⁺) (малиновый раствор); сыворотка, не содержащая НВе-антиген вируса гепатита В, инактивированная прогреванием (K⁻) (зеленый раствор); конъюгат – поликлональные антитела к НВе антигену из сыворотки реконвалесцентов, меченные пероксидазой хрена (концентрат конъюгата) (синий раствор); концентрат фосфатно-солевого буферного раствора, содержащий детергент — твин-80 (ФСРТ) (бесцветный раствор); цитратный буферный раствор с перекисью водорода (ЦБП) (бесцветный раствор); раствор для разведения конъюгата (РРК) (бесцветный раствор); тетраметилбензидин (ТМБ) (бесцветный раствор); физиологический раствор (ФР) (голубой раствор); раствор серной кислоты (стоп-реагент) (бесцветный раствор); полиэтиленовый пакет с молнией; инструкция по применению.

I. Для проведения работы необходимо подготовить реагенты.

Перед применением все реагенты необходимо выдержать при температуре 18–25°C в течение 30 мин. Иммуноферментный анализ рекомендуется проводить с использованием новых, не подвергавшихся обработке наконечников для пипеток.

В зависимости от числа исследуемых проб отбирают необходимое количество стрипов (полосок по 8 лунок в каждой). Остальные стрипы вынимают из рамки-держателя и хранят в закрытом полиэтиленовом мешке.

Растворы каждого компонента тест-системы и каждого исследуемого образца необходимо брать с помощью индивидуального наконечника для пипеток.

Раствор ФСРТ. Для получения рабочего раствора содержимое флакона с концентратом ФСРТ разводят в 500 мл дистиллированной воды. Раствор хранят до 5 дней при температуре 4–6°C.

Раствор анти-НВе для сорбции. Для получения рабочего раствора анти-НВе для сорбции концентрат анти-НВе разводят 1:20 на растворе ФР. Необходимый объем раствора анти-НВе определяется числом используемых стрипов. Хранят до 4 ч при температуре 4–6°C.

Раствор K⁺. Для получения рабочего раствора K⁺ концентрат НВе-антиген разводят 1:10 на растворе ФСРТ. При каждой постановке опыта готовят 200 мкл раствора K⁺. Для этого к 180 мкл раствора ФСРТ добавляют 20 мкл концентрата K⁺. Хранят в течение 4–6 часов при температуре 4–6°C.

Раствор конъюгата. Концентрат конъюгата разводят на растворе РРК 1:41. Необходимый объем раствора конъюгата определяется числом используемых стрипов. Хранят до 4 ч при температуре 4–6°C.

Субстратный раствор. Раствор ТМБ готовят непосредственно перед использованием. Необходимый объем раствора ТМБ определяется числом используемых стрипов. Смешиваемые реагенты тщательно перемешать. При приготовлении раствора ТМБ исключить действие света. Смесь реагентов хранению не подлежит!

Посуду, наконечники пипеток, ванночки для растворов, которые контактируют с раствором ТМБ, нельзя отмывать синтетическими моющими средствами, так как даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции.

II. Проведение иммуноферментного анализа.

1. Сорбция анти-НВе. Во все лунки стрипов вносят по 100 мкл голубого раствора анти-НВе. Планшет закрывают крышкой или помещают во влажный полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 12–24 ч при температуре 15–25°C.

2. Раствор из лунок вытряхивают или удаляют насосом и промывают 2 раза раствором ФСРТ, внося в каждую лунку по 200 мкл раствора с последующим удалением.

3. Связывание НВе-антигена. Одну из лунок (А1) оставляют незаполненной (контроль субстрата). В две лунки вносят по 100 мкл красного рабочего раствора K^+ , в две другие лунки вносят по 100 мкл зеленого раствора K^- , в остальные лунки вносят по 100 мкл исследуемых сывороток. Планшет закрывают крышкой или помещают во влажный полиэтиленовый пакет и инкубируют в течение 12–24 ч при температуре 18–25°C.

4. После инкубации промывают лунки 4-кратно раствором ФСРТ.

5. Связывание конъюгата. Во все лунки, кроме А1, вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. При внесении раствора конъюгата следует избегать прямого солнечного освещения планшета. Планшет закрывают крышкой или помещают во влажный полиэтиленовый пакет и инкубируют при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 2 ч во влажной камере.

6. После инкубации лунки промывают 6-кратно раствором ФСРТ, а затем 1 раз дистиллированной водой.

7. Проведение ферментативной реакции. Во все лунки вносят по 100 мкл субстратного раствора. При внесении субстратного раствора следует избегать прямого солнечного освещения планшета. Планшет закрывают крышкой и выдерживают в темноте при температуре 18–25°C в течение 15 ± 1 мин.

8. Остановка ферментативной реакции. Реакцию останавливают внесением в каждую лунку по 50 мкл раствора стоп-реагента. Учет результатов проводят не позднее 10–15 минут после внесения стоп-реагента!

III. Учет результатов.

Учет и интерпретация результатов ИФА. Содержимое лунок с контролем субстрата и K^- должно оставаться бесцветным или бледно-желтым, а содержимое лунок с K^+ должно приобрести ярко-желтую окраску. При визуальном учете исследуемый образец оценивается как положительный в том случае, если имеются отчетливые различия в интенсивности его окрашивания по сравнению с растворами в лунках с контролем субстрата и K^- .

Учет результатов инструментальный состоит в измерении оптической плотности исследуемых проб, которую проводят при длине волны 450 нм непосредственно в лунках планшета спектрофотометрически на плащечном фотометре. В качестве кюветы сравнения служит лунка А1 с контролем субстрата. При правильном проведении анализа среднее значение ОП в лунках с K^+ должно быть в интервале 0,5–2,0 оптических единиц, а в лунках с K^- — не должно превышать 0,20 о.е.

Оценка результатов ИФА проводится по формуле:

$$K = 0,20 + \text{Среднее значение ОП для } K^-.$$

1. Если ОП исследуемой пробы больше K , то ее исследуют повторно в дубликате и при воспроизведении аналогичного результата считают содержащей HBe-антиген вируса гепатита В.

2. Если ОП исследуемой пробы меньше или равно K , то считают, что она не содержит HBe-антиген вируса гепатита В.

Вывод делают на основании полученных результатов. По предложенной схеме документирования результатов ИФА оформляют протокол, включая протокол серологического исследования.

По окончании выполнения работы производят уборку и обработку рабочих поверхностей, используя дезинфицирующие растворы (обработка поверхности столов, оборудования, посуды, пипеток), все использованные материалы подвергают обработке такими дезинфицирующими растворами как 6%-ный раствор перекиси водорода или 3%-ный раствор монохлорамина; использованные наконечники обрабатывают 20%-ным раствором этилового спирта.

Записи производят в журнале исследований и журналах по использованию оборудования в лаборатории.

4.6. Исследование сыворотки или плазмы крови на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg)

Для определения наличия поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке или плазме крови используют тест-систему иммуноферментную «DIA-HBV» (производитель — АОЗТ НПК «ДиаПроф Мед»).

Цель работы: исследование сыворотки или плазмы крови человека на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В.

Для работы необходимы набор «DIA-HBV» тест-системы иммуноферментной для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (с достаточным сроком годности); средства индивидуальной защиты — халат, очки, маска, перчатки; дистиллированная вода, 6%-ная перекись водорода; 3%-ный раствор монохлорамина; 20%-ный раствор этилового спирта; 70%-ный спирт этиловый; вата гигроскопическая; фильтровальная бумага; пипетки одноканальные (5–40, 20–200, 200–1000 мкл) и наконечники к ним; пипетки 8-канальные (50–300 мкл) и наконечники к ним; стаканы для приготовления растворов, мерный стакан и цилиндр (1000 мл); штативы; пробирки; ванночки для реагентов; флаконы для реактивов, 20 мл; суховоздушный термостат на 37°C; автоматический промыватель планшетов (вошер); фотометр (АИФ) для измерения оптической плотности в планшете; контейнер для сбора твердых загрязненных отходов; контейнер для слива отработанных загрязненных жидкостей и свежеприготовленные дезинфицирующие растворы; карта-схема расстановки сывороток в штативе. Объект исследования — сыворотка крови человека.

Ход работы

С тест-системой следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом и соблюдать все меры предосторожности.

В состав набора тест-системы входят восьмилучные стрипы, концентрат раствора для промывания планшета, иммуносорбент, положительный контроль (K^+), отрицательный контроль (K^-), конъюгат иммуноферментный, раствор для разведения конъюгата, концентрат раствора для приготовления проявителя, хромоген ОФД, стоп-реагент 2М H₂SO₄, клейкая пленка, инструкция по применению.

В набор тест-системы входят иммуносорбент (полистироловый планшет, лунки которого сенсibilизированы моноклональными антителами к HBsAg) и иммуноферментный конъюгат (с моноклональными антителами к HBsAg, конъюгированными с пероксидазой хре-

на). При внесении в лунки планшета образцов сывороток инфицированной крови НВsAg, он связывается со специфическими антителами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Образованные комплексы выявляют при помощи специфического к НВsAg иммуноферментного конъюгата. После отмывания несвязавшихся компонентов в лунки добавляют раствор проявителя — субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена (ортофенилендиамин — ОФД). Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (2М раствор серной кислоты), и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках, которая при длине волны 492 нм пропорциональна концентрации НВsAg в образцах сывороток или плазмы крови.

I. Для проведения работы необходимо подготовить реагенты

Подготовка образцов. Образцы сывороток или плазмы хранят при температуре 2–8°C в течение 72 часов. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже минус 20°C) не более двух раз. Необходимо осветлять образцы сывороток (плазмы), содержащие агрегаты и осадок, при помощи центрифугирования. Образцы с азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией или бактериальным проростом не пригодны для анализа.

Подготовка реагентов. Перед применением все реагенты выдерживают при температуре 18–22°C в течение 30 мин. Иммуноферментный анализ рекомендуется проводить с использованием новых, не подвергавшихся обработке наконечников для пипеток.

Подготовка к анализу раствора для промывания планшета. Чтобы приготовить раствор для промывания планшета необходимо отобрать 8 мл его концентрата (раствора для промывания планшета) из флакона и растворить его в 240 мл дистиллированной воды, перемешать. Если концентрат раствора содержит кристаллы, его прогревают перед использованием при температуре 35–37°C до полного растворения кристаллов. Раствор допускается хранить при температуре 2–8°C не более 5 суток.

Подготовка раствора конъюгата. Раствор готовят непосредственно перед использованием! В чистый флакон отбирают 2 мл раствора для разведения конъюгата и добавляют 200 мкл конъюгата. Тщательно перемешивают, не допуская пенообразования.

Раствор проявителя. Готовят его непосредственно перед применением! В чистый флакон вносят таблетку хромогена (ОФД) и добавляют 9 мл дистиллированной воды, интенсивно встряхивают и оставляют флакон в темном месте до полного растворения хромогена. Не-

посредственно перед внесением в лунки стрипов к раствору хромогена добавляют 3 мл концентрата раствора для приготовления проявителя, смесь интенсивно встряхивают. Раствор проявителя необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор должен быть бесцветным.

II. Проведение иммуноферментного анализа:

1) Перед проведением анализа определяют необходимое для исследования количество стрипов, освобождают их от упаковки, вставляют в рамку. Оставшиеся стрипы хранят в плотно закрытом пакете при температуре 2–8°C в течение одного месяца.

2) Готовят раствор для промывания планшета (смотри выше).

3) В лунки стрипов вносят по 100 мкл образцов исследуемых сывороток, оставив свободными 5 лунок первого ряда (лунки для контролей).

4) В две лунки (A1, B1) вносят по 100 мкл положительного контроля (K^+), а в три другие (C1–E1) — по 100 мкл отрицательного контроля (K^-).

5) Готовят раствор конъюгата (смотри выше).

6) Выдерживают стрипы при 18–22°C в течение 10 минут и добавляют в каждую лунку поверх исследуемых и контрольных образцов сывороток по 50 мкл раствора конъюгата. Сразу после внесения конъюгата, планшет устанавливают на автоматический встряхиватель и перемешивают содержимое лунок (при малой амплитуде встряхивания) в течение 15–20 секунд.

7) Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют их при 37°C в термостате в течение 2 часов.

8) После окончания инкубации удаляют содержимое лунок при помощи автоматического промывателя планшетов (вошера) или 8-канальной пипетки. Промывают лунки шесть раз промывочным раствором с экспозицией раствора в лунках в течение 40–60 секунд для каждого цикла промывания, после чего удаляют остатки влаги (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).

9) Готовят раствор проявителя (смотри выше).

10) В лунки стрипов вносят по 100 мкл раствора проявителя.

11) Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют их при 18–22°C в темном месте в течение 30 минут.

12) Останавливают цветную реакцию внесением во все лунки по 50 мкл стоп-реагента.

13) Не более чем через 1 минуту после остановки цветной реак-

ции определяют оптическую плотность в лунках в двухволновом режиме (492 нм относительно 620 нм) или в одноволновом режиме при длине волны 492 нм.

III. Учет результатов.

Производят расчет среднего значения оптической плотности (ОП) для лунок отрицательного контроля (ОПср K^-) и для положительного контроля (ОПср K^+).

Проведение анализа считают корректным, если ОПср K^- не выше 0,1 оптической единицы, а ОПср K^+ не ниже 0,6 о.е. Если среднее значение отрицательного контроля больше 0,010 о.е., то все значения отрицательного контроля должны не более чем в 2 раза превышать ОПср K^- . В случае, если одно из значений K^- более чем в два раза превышает ОПср K^- , его отбрасывают и ОПср K^- рассчитывают по оставшимся значениям ОПср K^- . Если среднее значение отрицательного контроля меньше или равно 0,010 о.е., то все значения отрицательного контроля должны находиться в интервале от $-0,010$ до $+0,010$ от среднего значения K^- . В случае, если одно из значений K^- не соответствует этому условию, его отбрасывают и ОПср K^- рассчитывают по оставшимся значениям ОПср K^- .

Граничное значение ОП (ГЗ). ГЗ рассчитывают, добавляя константную величину 0,06 к величине ОПср K^- .

Результаты анализа считаются отрицательными, если значение ОП исследуемого образца меньше ГЗ.

Результаты анализа считаются положительными, если значения ОП исследуемого образца больше ГЗ.

Образцы, давшие положительный результат, необходимо исследовать повторно не менее чем в двух лунках тест-системы:

- образцы положительные в одной или более лунках следует считать положительными;
- образцы отрицательные в двух или более лунках следует считать отрицательными.

Вывод делают на основании полученных результатов. По предложенной схеме документирования результатов ИФА оформляют протокол, включая протокол серологического исследования.

По окончании выполнения работы производят уборку и обработку рабочих поверхностей, используя дезинфицирующие растворы (обработка поверхности столов, оборудования, посуды, пипеток), все использованные материалы подвергают обработке такими дезинфицирующими растворами как 6%-ный раствор перекиси водорода или

3%-ный раствор монохлорамина; использованные наконечники обрабатывают 20%-ным раствором этилового спирта.

Записи производят в журнале исследований и журналах по использованию оборудования в лаборатории.

4.7. Исследование сыворотки крови человека для подтверждения наличия поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg)

Для подтверждения наличия поверхностного антигена вируса гепатита В в образцах сывороток и плазмы крови человека после первичного скрининга методом ИФА применяют «DIA-C-HBV» тест-систему иммуноферментную (производитель — АОЗТ НПК «Диа-Проф Мед»).

Основными компонентами набора являются иммуносорбент, иммуноферментный конъюгат и нейтрализационный компонент (НК). Иммуносорбент — полистероловый планшет, лунки которого сенсibilизированы моноклональными антителами к HBsAg. Иммуноферментный конъюгат — моноклональные антитела к HBsAg, конъюгированные с пероксидазой хрена. НК — моноклональные антитела к HBsAg.

В лунках планшета при внесении в них образцов сывороток инфицированной крови HBsAg происходит реакция связывания антигена со специфическими антителами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Образованные комплексы выявляют при помощи специфического к HBsAg иммуноферментного конъюгата. После отмывания несвязавшихся компонентов в лунки добавляют раствор субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена (ортофенилендиамин — ОФД). Пероксидазную реакцию останавливают добавлением стоп-реагента (2М раствор серной кислоты) и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках, которая при длине волны 492 нм пропорциональна концентрации HBsAg в образцах сывороток или плазмы крови.

Данный метод подтверждения результатов скринингового анализа на наличие HBsAg основан на принципе блокирования поверхностного антигена вируса гепатита В в образцах сывороток моноклональными антителами против HBsAg (нейтрализационным компонентом). При внесении в реакционную среду НК происходит ингибирование образования комплекса антиген-антитело на твердой фазе за счет связывания антигенных детерминант HBsAg моноклональными антителами нейтрализационного компонента, снижая тем самым оптическую плотность окрашенного раствора в лунках.

Цель работы: исследование сыворотки или плазмы крови человека для подтверждения наличия поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg).

Для работы необходимы набор «DIA-C-HBV» тест-системы иммуноферментной для подтверждения наличия поверхностного антигена вируса гепатита В (с достаточным сроком годности); средства индивидуальной защиты — халат, очки, маска, перчатки; дистиллированная вода, 6%-ная перекись водорода; 3%-ный раствор монохлорамина; 20%-ный раствор этилового спирта; 70%-ный спирт этиловый; вата гигроскопическая; фильтровальная бумага; пипетки одноканальные (5–40, 20–200, 200–1000 мкл) и наконечники к ним; пипетки 8-канальные (50–300 мкл) и наконечники к ним; стаканы для приготовления растворов, мерный стакан и цилиндр (1000 мл); штативы; пробирки; ванночки для реагентов; флаконы для реактивов, 20 мл; сушевоздушный термостат на 37°C; автоматический промыватель планшетов (вошер); фотометр (АИФ) для измерения оптической плотности в планшете; контейнер для сбора твердых загрязненных отходов; контейнер для слива отработанных загрязненных жидкостей и свежеприготовленные дезинфицирующие растворы; карта-схема расстановки сывороток в штативе. Объект исследования — сыворотка или плазма крови человека.

Ход работы

Выполнение работы следует проводить только после тщательного изучения инструкции к набору.

В состав набора тест-системы входит концентрат раствора для промывания планшета, иммуносорбент, раствор для разведения сывороток, раствор для разведения конъюгата, концентрат раствора для приготовления проявителя, конъюгат иммуноферментный, хромоген ОФД, нейтрализационный компонент, положительный контроль (K^+), отрицательный контроль (K^-), стоп-реагент 2М серная кислота, клейкая лента, инструкция по применению.

I. Для проведения работы необходимо подготовить образцы и реагенты:

Образцы. Образцы сывороток или плазмы хранят при температуре 2–8°C в течение 72 часов. Допускается замораживание образцов (до температуры +20°C) не более двух раз. Необходимо осветлять образцы сывороток (плазмы), содержащие агрегаты и осадок, при помощи центрифугирования. Внимание! Образцы с азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией или бактериальным проростом не пригодны для анализа.

Реагенты. Подготовка реагентов к анализу осуществляется из расчета на 32 лунки.

Перед выполнением работы компоненты набора выдерживают при 18–22°C в течение 30 минут.

1. Приготовление раствора для промывания планшета. Содержимое флакона с концентратом раствора для промывания планшета интенсивно встряхивают. Отбирают 8 мл концентрата и растворяют в 240 мл дистиллированной воды, перемешивают. Если концентрат раствора содержит кристаллы, его прогревают перед использованием при 35–37°C до полного растворения кристаллов. Раствор можно хранить при температуре 2–8°C не более 5 суток.

2. Приготовление раствора конъюгата. Отбирают в чистый флакон 2 мл раствора для разведения конъюгата и добавляют 200 мкл конъюгата. Содержимое флакона тщательно перемешивают, не допуская пенообразования. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

3. Приготовление раствора конъюгата с нейтрализационным компонентом. Отбирают в чистый флакон 1 мл раствора конъюгата (п. 2) и добавляют 50 мкл нейтрализационного компонента. Содержимое флакона тщательно перемешивают, недопуская пенообразования. Готовят раствор непосредственно перед употреблением.

4. Приготовление раствора проявителя. В чистый флакон вносят таблетку хромогена (ОФД) и добавляют 9 мл дистиллированной воды, интенсивно встряхивают и оставляют флакон в темном месте до полного растворения хромогена. Перед внесением в лунки планшета к раствору хромогена добавляют 3 мл концентрата раствора для приготовления проявителя, смесь встряхивают. Готовят раствор непосредственно перед применением! Раствор проявителя необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов! Перед использованием раствор проявителя должен быть прозрачным и бесцветным.

II. Проведение иммуноферментного анализа

Проведение анализа начинают с освобождения от упаковки необходимого количества стрипов, которые вставляют в рамку. Остальные стрипы хранят в плотно закрытом пакете при температуре 2–8°C в течение одного месяца.

Готовят раствор для промывания планшета.

В лунки A1, A2 вносят по 100 мкл положительного контроля (K⁺), а в лунки B1 и B2 — по 90 мкл раствора для разведения сывороток и

10 мкл положительного контроля (разведение K^+ 1:10). В четыре лунки (С1, С2, D1, D2) вносят по 100 мкл отрицательного контроля (K^-).

Исследуемые образцы сывороток вносят по 100 мкл в лунки согласно карте-схеме (таблица 2).

Таблица 2 — Карта-схема

	1	2	3	4
А	K^+ (нативная)	K^+ (нативная)	№ 5 (нативная)	№ 5 (нативная)
В	K^+ (1:10)	K^+ (1:10)	№ 6 (нативная)	№ 6 (нативная)
С	K^- (нативная)	K^- (нативная)	№ 7 (нативная)	№ 7 (нативная)
Д	K^- (нативная)	K^- (нативная)	№ 8 (нативная)	№ 8 (нативная)
Е	№ 1 (нативная)	№ 1 (нативная)	№ 9 (нативная)	№ 9 (нативная)
Ф	№ 2 (нативная)	№ 2 (нативная)	№ 10 (нативная)	№ 10 (нативная)
Г	№ 3 (нативная)	№ 3 (нативная)	№ 11 (нативная)	№ 11 (нативная)
Н	№ 4 (нативная)	№ 4 (нативная)	№ 12 (нативная)	№ 12 (нативная)
	Раствор конъюгата без НК			
	Раствор конъюгата с НК			

Внимание! Образцы с высокой концентрацией НВsAg ($ОП > 2,0$), если они не разведены, могут не нейтрализоваться нейтрализационным компонентом. Такие образцы следует разводить 1:10, 1:100 или более раствором № 3 для разведения сывороток.

Готовят раствор конъюгата (согласно п. 2).

Готовят раствор конъюгата с нейтрализационным компонентом (согласно п. 3).

Выдерживают стрипы при 18–22°C в течение 10 минут и добавляют в каждую лунку нечетных (неокрашенных в таблице 2) рядов поверх исследуемых и контрольных образцов сывороток по 50 мкл раствора конъюгата, а в лунки четных (окрашенных в таблице 2) по 50 мкл раствора конъюгата с нейтрализационным компонентом. По окончании внесения конъюгата устанавливают планшет на автоматический встряхиватель и перемешивают содержимое лунок (при малой амплитуде встряхивания) в течение 15–20 секунд.

Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют их при 37°C в термостате в течение 2 часов.

После окончания инкубации удаляют содержимое лунок при помощи автоматического промывателя. Промывают лунки шесть раз раствором для промывания планшета с экспозицией раствора в лунках в течение 40–60 секунд для каждого цикла промывания, после чего удаляют остатки влаги (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).

Готовят раствор проявителя (согласно п. 4).

Вносят в лунки стрипов по 100 мкл раствора проявителя.

Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при 18—22°C в темном месте в течение 30 минут.

Останавливают цветную реакцию внесением во все лунки по 50 мкл стоп-реагента.

Не более чем через 1 минуту после остановки цветной реакции определяют оптическую плотность в лунках в двухволновом режиме (492 нм относительно 620 нм) или в одноволновом режиме при длине волны 492 нм.

III. Учет результатов

Учет результатов проводят спектрофотометрически на плашечном фотометре предпочтительно при двух длинах волн. Рассчитывают среднее значение оптической плотности (ОП) для лунок отрицательного контроля (ОП_{ср} К⁻) без НК. Проведение анализа считают корректным, если ОП_{ср} К⁻ не выше 0,1 оптической единицы (ОЕ), а ОП К⁺ (нативный) не ниже 0,6 о.е. и процент нейтрализации положительного контроля составляет не менее 50% при исследовании нативного образца или в разведении 1:10. Рассчитывают процент нейтрализации для положительного контроля и для исследуемых образцов по формуле:

$$\% \text{нейтрализации} = \frac{\text{ОП (не нейтрал. образца)} - \text{ОП (нейтрал. образца)}}{\text{ОП (не нейтрал. образца)} - \text{ОП}_{\text{ср}} \text{ К}^-} \times 100.$$

Граничное значение ОП (ГЗ). ГЗ рассчитывают добавляя константную величину 0,06 к величине ОП_{ср} К⁻.

Результаты анализа считаются отрицательными, если:

- значение ОП исследуемого образца меньше ГЗ;
- значение ОП исследуемого образца больше ГЗ, но процент нейтрализации составляет менее 50% для всех его разведений.

Результаты анализа считаются положительными, если значение ОП исследуемого образца больше ГЗ и процент нейтрализации составляет не менее 50 % хотя бы для одного из его разведений.

Например, ОП не нейтрал. образца = 1,584, ОП нейтрал. образца = 0,245,

ОП_{ср} К⁻ = 0,029,

$$\% \text{нейтрал.} = \frac{1,584 - 0,245}{1,584 - 0,029} \times 100 = 86\% \text{ — положительная сыворотка}$$

ОП не нейтрал. образца = 0,250, ОП нейтрал. образца = 0,180,

ОП_{ср} К⁻ = 0,029

$$\% \text{ нейтрал.} = \frac{0,250 - 0,180}{0,250 - 0,029} \times 100 = 31\% \text{ — отрицательная сыворотка.}$$

Внимание! Поскольку в исследуемых образцах могут быть иммунные комплексы, которые в нативной сыворотке могут блокировать сайты связывания антигена, значения ОП разведенной сыворотки по отношению к нативной могут повышаться (**феномен Дениша**).

Вывод делают на основании полученных результатов. По предложенной схеме документирования результатов ИФА оформляют протокол, включая протокол серологического исследования.

По окончании выполнения работы производят уборку и обработку рабочих поверхностей, используя дезинфицирующие растворы (обработка поверхности столов, оборудования, посуды, пипеток), все использованные материалы подвергают обработке такими дезинфицирующими растворами как 6%-ный раствор перекиси водорода или 3%-ный раствор монохлорамина; использованные наконечники обрабатывают 20%-ным раствором этилового спирта.

Записи производят в журнале исследований и журналах по использованию оборудования в лаборатории.

4.8. Исследование на выявление в сыворотке крови человека антитела к ВГС (IgG)

Для выявления в сыворотке крови человека антитела к ВГС (IgG) используют диагностическую иммуноферментную тест-систему «РекомбиБест анти-ВГС — стрип», который представляет собой набор компонентов, основой которого являются рекомбинантные антигены вируса гепатита С (ВГС), соответствующие участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS3, NS4, NS5) областью генома ВГС, иммобилизованные на поверхности лунок разборного полистиролового планшета.

Свойства тест-системы направлены на выявление в сыворотке (плазме) крови человека антител к ВГС (IgG) за счет их взаимодействия с рекомбинантными антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок планшета. Образование комплекса антиген-антитело выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата.

Используют данную тест-систему как для выявления антител к вирусу гепатита С в сыворотке (плазме) крови доноров, так и для дифференциальной диагностики вирусных гепатитов.

Цель работы: выявление антител к вирусу гепатита С в сыворотке (плазме) крови человека.

Материалы и оборудование: набор тест-системы для определения антител класса IgG и IgM к антигенам вируса гепатита С (с достаточным сроком годности); средства индивидуальной защиты — халат, очки, маска, перчатки; дистиллированная вода, 6%-ная перекись водорода; 3%-ный раствор монохлорамина; 20%-ный раствор этилового спирта; 70%-ный спирт этиловый; вата гигроскопическая; фильтровальная бумага; пипетки одноканальные (5–40, 20–200, 200–1000 мкл) и наконечники к ним; пипетки 8-канальные (50–300 мкл) и наконечники к ним; стаканы для приготовления растворов, мерный стакан и цилиндр (1000 мл); штативы; пробирки; ванночки для реагентов; флаконы для реактивов, 20 мл; суховоздушный термостат на 37°C; автоматический промыватель планшетов (вошер); фотометр (АИФ) для измерения оптической плотности в планшете; контейнер для сбора твердых загрязненных отходов; контейнер для слива отработанных загрязненных жидкостей и свежеприготовленные дезинфицирующие растворы; карта-схема расстановки сывороток в штативе. Объект исследования — сыворотка крови человека.

Ход работы

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом: работать в халатах, резиновых перчатках, очках, не пипетировать растворы ртом, все использованные материалы подвергать обработке 6%-ным раствором перекиси водорода (не менее 6 часов). При использовании в работе автоматического вошера или гребенки необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть засоров и раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70%-ным спиртом.

Необходимо использовать в работе только чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

Нельзя использовать проросшие, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию. Сыворотки, содержащие осадок, могут дать неправильный результат, поэтому перед использованием их следует центрифугировать 10–15 мин при 3000 об./мин.

Желательно использовать свежееотобранные образцы сыворотки (плазмы) крови. Допускается использование образцов, хранившихся при 2–10°C не более 5 суток, либо при минус 20 ± 3°C не более 1 месяца.

Запрещается многократное использование планшета для предварительного нанесения сывороток.

Перекисью водорода (другие дезинфицирующие растворы не использовать) обрабатывать только наконечники для пипеток, используемые для работы с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами. В случае их повторного использования, обезвреживать в 6%-ной перекиси водорода (не менее 6ч) с последующей 10-кратной промывкой в проточной воде, 3-кратной промывкой в дистиллированной воде и кипячением (40 мин) в последней из 3-х порций дистиллированной воды, чтобы избавиться от следов перекиси. Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с хромогеном (ОФД, ТМБ), в случае повторного использования, сразу после работы необходимо промыть 50%-ным раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой. Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, предназначенные для работы с ОФД, не использовать для работы с ТМБ. Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70%-ным раствором этилового спирта (не использовать перекись водорода, хлорамин и другие дезинфицирующие средства).

Перед постановкой реакции все компоненты тест-системы необходимо выдержать не менее 30 мин при комнатной температуре 18–25°C. Отобрать необходимое количество стрипов, а оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. После постановки реакции плотно закрытые флаконы с исходными компонентами, упакованные стрипы поместить в холодильник 2–10°C, использовать в течение 1 месяца.

В состав набора тест-системы входят: планшет разборный с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВГС — 1 шт.; положительный контрольный образец, инактивированный (K^+) — 1 шт.; отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^-) — 1 шт.; конъюгат (антитела диагностические против иммуноглобулинов человека, меченные пероксидазой хрена) — 1 фл. или 2 фл.; раствор для разведения сывороток (РС, жидкость красного цвета) — 1 фл., 13 мл; раствор для разведения конъюгата (РС, жидкость зеленого цвета) — 1 фл., 13 мл; раствор для предварительного разведения (РПР) — 1 фл., 3 мл; концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т) — 1 фл., 28 мл; цитратно-фосфатный буферный раствор с перекисью водорода (ЦФР) — 1 фл., 13 мл; тетраметилбензидин (ТМБ) — 1 фл., 1,5 мл; стоп-реагент — 1 фл., 12 мл; клейкая пленка для планшета — 3 шт.; пластиковая емкость — 2 шт.; одноразовые наконечники — 16 шт.; инструкция по применению тест-системы.

I. Подготовка реагентов.

1. Приготовление промывочного раствора (для промывки лунок стрипов). Взболтать содержимое флакона с концентратом ФСБ-Т. При выпадении в концентрате осадка солей прогреть его до полного растворения осадка. Отобрать необходимое количество (в соответствии с числом используемых стрипов, так как набор рассчитан на 96 анализов, включая контроли, и возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов, включая контроли) концентрата ФСБ-Т и развести его дистиллированной водой до соответствующего объема. Хранение допустимо при 2–10°C до 72 ч.

2. Подготовка контрольных образцов. Раствор для предварительного разведения (РПР) тщательно взболтать. Растворить контрольные образцы K^+ и K^- добавлением в каждый флакон по 600 мкл РПР. Хранение допустимо при 2–10°C до 1 месяца.

3. Приготовление раствора конъюгата. Готовится раствор непосредственно перед использованием и в пластиковой емкости, которая входит в состав набора. Для работы с конъюгатом рекомендуется использовать одноразовые наконечники, прилагаемые к пластиковой емкости в упаковке. Раствор для предварительного разведения (РПР) тщательно взбалтывается. Готовится предварительное разведение конъюгата путем растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1 мл РПР. Раствор для разведения конъюгата (РК) тщательно взболтать. В пластиковую емкость отобрать необходимое количество предварительно разведенного конъюгата, добавить соответствующее количество РК (все отбирается в зависимости от количества используемых стрипов), тщательно перемешать пипетированием. Хранение: конъюгат в предварительном разведении — при 2–10°C до 1 месяца.

4. Приготовление раствора хромогена. Раствор хромогена готовится непосредственно перед применением и в пластиковой емкости, входящей в состав набора, где также имеются наконечники для пипеток, которые рекомендуется использовать только для работы с хромогеном. В пластиковую емкость отобрать необходимое количество ТМБ и добавить к нему соответствующее количество ЦФР, тщательно перемешать.

II. Проведение иммуноферментного анализа.

Подготовить для работы необходимое количество стрипов, а оставшиеся упаковать в цефленовый пакет с влагопоглотителем, свернув несколько раз край пакета и закрепив канцелярскими скрепками с двух сторон. Хранить пакет со стрипами при 2–10°C до 1 месяца.

Приготовить промывочный раствор и контрольные образцы (см. выше п.1 и п.2).

Перед постановкой ИФА лунки стрипов промыть однократно промывочным раствором. Промывку осуществлять при помощи автоматического промывателя или вручную. Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (вносить 300 мкл раствора). По окончании промывки необходимо тщательно удалить влагу из лунок, постукивая перевернутыми стрипами по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге. Не допускать высыхания лунок стрипов между отдельными операциями при постановке реакции.

Во все лунки стрипов внести по 80 мкл РС. В любые 2 лунки внести по 20 мкл раствора K^- , в 2 другие — по 20 мкл K^+ , одну лунку оставить с РС — контроль конъюгата.

Во все остальные лунки внести по 20 мкл испытуемых сывороток, получая, таким образом, конечное разведение сывороток 1:5. Внесение сывороток должно сопровождаться тщательным перемешиванием с помощью пипетирования (не менее 4 раз).

Стрипы заклеить клейкой пленкой и инкубировать 30 минут при 37°C. В это время приготовить раствор конъюгата (см. выше п.3).

По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз промывочным раствором и удалить влагу, как описано выше.

В каждую лунку внести по 100 мкл раствора конъюгата. Для внесения раствора конъюгата использовать пластиковую емкость и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Стрипы заклеить клейкой пленкой и инкубировать 30 минут при 37°C.

По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть стрипы 5 раз промывочным раствором и удалить влагу, как описано выше.

Приготовить раствор хромогена и внести по 100 мкл раствора хромогена (используя пластиковую емкость и одноразовые наконечники, входящие в состав набора).

Поместить планшет со стрипами в защищенное от света место при температуре 18–25°C.

Реакцию остановить добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента и немедленно провести учет результатов.

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела, а при попадании промыть большим количеством воды.

III. Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) на длине волны 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществляется по воздуху.

Результаты исследований оценивают только в том случае, если значение ОП в контроле конъюгата (ОП_{кк}) и в отрицательном контроле (ОП К⁻) не более 0,2 о.е., а значение ОП К⁺ не ниже 0,8 о.е.

По результатам ИФА следует рассчитать ОП критическую (ОП_{крит}) по формуле, если ОП (К⁺) больше 2 о.е., то

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}(\text{К}^-) + 0,2,$$

если ОП (К⁺) меньше 2 о.е., то

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{ОП}(\text{К}^-) + 0,1 \times \text{ОП}(\text{К}^+).$$

Для интерпретации результатов исследования сывороток использовать коэффициент позитивности (КП) в условных единицах:

$$\text{КП} = \text{ОП}_{\text{иссл. сыв.}} / \text{ОП}_{\text{крит.}}$$

Если КП < 1, результат оценивают как отрицательный. Если КП > 1, исследуемую сыворотку следует расценивать как положительно реагирующую.

Коэффициент позитивности — удобная и простая величина для наблюдения заболевания в динамике.

При визуальной регистрации результат реакции считать положительным, если имеются отчетливые различия в интенсивности окраски в лунке с испытуемой сывороткой по сравнению с К⁻.

При обнаружении положительно реагирующей сыворотки этот образец необходимо исследовать повторно в этой же тест-системе параллельно в двух лунках (для воспроизведения положительного результата или исключения технической ошибки), либо в подтверждающем тесте, обладающем большей чувствительностью и специфичностью.

Вывод делают на основании полученных результатов. По предложенной схеме документирования результатов ИФА оформляют протокол, включая протокол серологического исследования.

По окончании выполнения работы производят уборку и обработку рабочих поверхностей, используя дезинфицирующие растворы (обработка поверхности столов, оборудования, посуды, пипеток), все использованные материалы подвергают обработке такими дезинфи-

цирующими растворами как 6%-ный раствор перекиси водорода или 3%-ный раствор монохлорамина; использованные наконечники обрабатывают 20%-ным раствором этилового спирта.

Записи производят в журнале исследований и журналах по использованию оборудования в лаборатории.

4.9. Исследование сыворотки крови человека на наличие антител к вирусу гепатита С

Для определения антител к вирусу гепатита С в сыворотке крови применяют и иммуноферментную тест-систему («ВГС-КОНТРОЛЬ»).

В набор тест-системы входят иммуносорбент, содержащий рекомбинантные антигены вируса гепатита С (ВГСAg), аналогичные структурным (core-Ag) и неструктурным (NS3-Ag, NS4-Ag и NS5-Ag) белками вируса гепатита С, сорбированные на полистирольном планшете; конъюгат моноклональных антител мыши против IgG и IgM человека с пероксидазой хрена (11-кратный концентрат); положительный контрольный образец — K^+ — сыворотка крови человека, содержащая антитела к вирусу гепатита С (анти-ВГС), не содержащая HbsAg и антитела к ВИЧ – 1,2, которая инактивирована прогреванием в течение 3 ч при температуре 56°C; отрицательный контрольный образец — K^- — сыворотка крови человека, не содержащая анти-ВГС, не содержащая HbsAg и антитела к ВИЧ — 1,2, инактивированная прогреванием в течение 3 ч при температуре 56°C; блок-раствор для разведения исследуемых сывороток; солевой раствор для разведения концентрата конъюгата; фосфатно-солевой раствор с твином-20 (ФСР-Т, 25-кратный концентрат), субстратный буферный раствор (СБ); хромоген тетраметилбензидин (ТМБ); стоп-реагент — серная или соляная кислота в концентрации 1 моль/л.

Набор тест-системы рассчитан на проведение 96 анализов на присутствие анти-ВГС с учетом контрольных с возможностью дробного 6-разового использования его на протяжении срока годности тест-системы.

В состав тест-системы входят такие компоненты, как концентрат конъюгата и ФСР-Т (бесцветные или желтоватого цвета жидкости, прозрачные или слегка опалесцирующие, в концентрате ФСР-Т допустимо образование кристаллического осадка, полностью распадающегося при температуре от 35 до 39°C; K^+ — красного цвета; K^- — зеленого цвета; солевой раствор для разведения концентрата конъюгата — прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость желтого цвета, допус-

тимо образование аморфного осадка; блок-раствор — непрозрачная жидкость голубого цвета, допустимо образование аморфного осадка, перед употреблением солевой раствор и блок-раствор необходимо тщательно взбалтывать до получения гомогенной смеси; СБ, ТМБ и стоп-реагент — прозрачные бесцветные жидкости; ТМБ может иметь голубоватый или желтоватый оттенок.

Иммунобиологические свойства тест-системы, форма выпуска.

Тест-система выявляет антитела класса IgG и IgM к антигенам вируса гепатита С в сыворотке (плазме) крови людей при помощи иммуноферментного анализа. В наборе использованы рекомбинантные антигены и инактивированная, содержащая анти-ВГС сыворотка, поэтому с тест-системой и исследуемыми образцами следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом (работать в резиновых перчатках, не пипетировать ртом и др.). Твердые отходы обеззараживают погружением в 6%-ный раствор перекиси водорода с 0,5%-ный СМС или 3%-ный раствор хлорамина Б. Длительность дезактивации не менее 1 ч. Твердые отходы можно обеззараживать автоклавированием в течение 1 ч при 124–128°C и давлении 1,5 кгс/см². Жидкие отходы (все промывные растворы) обезвреживают добавлением равного объема свежеприготовленного 6%-ного раствора хлорамина Б. Длительность дезактивации не менее 1 ч. Инструменты и оборудование до и после работы несколько раз протирать 70%-ным спиртом.

Цель работы: специфическая диагностика вирусного гепатита С путем определения анти-ВГС класса IgG и IgM в сыворотке крови (или плазме) человека.

Материалы и оборудование: набор тест-системы для определения антител класса IgG и IgM к антигенам вируса гепатита С (с достаточным сроком годности); средства индивидуальной защиты — халат, очки, маска, перчатки; дистиллированная вода, 6%-ная перекись водорода; 3%-ный раствор монохлорамина; 20%-ный раствор этилового спирта; 70%-ный спирт этиловый; вата гигроскопическая; фильтровальная бумага; пипетки одноканальные (5–40, 20–200, 200–1000 мкл) и наконечники к ним; пипетки 8-канальные (50–300 мкл) и наконечники к ним; стаканы для приготовления растворов, мерный стакан и цилиндр (1000 мл); штатив; пробирки; ванночки для реагентов; флаконы для реактивов, 20 мл; суховоздушный термостат на 37°C; автоматический промыватель планшетов (вошер); фотометр (АИФ) для измерения оптической плотности в планшете; контейнер для сбора твердых загрязненных отходов; контейнер для слива отработанных

загрязненных жидкостей и свежеприготовленные дезинфицирующие растворы; карта-схема расстановки сывороток в штативе. Объект исследования — сыворотка (или плазма) крови человека.

Ход работы

Выполнение работы следует проводить только после тщательного изучения инструкции к набору, где могут быть сделаны пометки, например, объемы растворов, рассчитанные на проведение анализов на 2 стрипах.

Наборы тест-системы упакованы в коробки по 2 шт (192 определения).

В состав набора тест-системы входят иммуносорбент на разборном планшете, конъюгат (концентрат 11-кратный), положительный контроль K^+ (2,0 мл), отрицательный контроль K^- (5,0 мл), блок-раствор (8,0 мл), стоп-реагент (10,0 мл), солевой раствор (по 15,0 мл), ФСР–Т (концентрат 25х по 20,0 мл), СБ (по 10,0 мл), ТМБ (4,0 мл), рамка для стрипов, инструкция по применению.

I. Для проведения работы необходимо подготовить реагенты.

Подготовка исследуемых образцов. Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо отбирать и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный прирост, нельзя подвергать исследуемые образцы термоинаktivированию. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлять центрифугированием. Отобранные образцы сывороток хранят при температуре $6\pm 2^\circ\text{C}$ не более 72 часа. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20°C с исключением многократного оттаивания-замораживания (не более 1 раза). Ложные результаты могут быть получены у образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным проростом. Каждый образец сыворотки или раствор необходимо отбирать чистым наконечником.

Приготовление растворов. При приготовлении растворов нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов! Перед использованием все реагенты выдерживают 30 мин при температуре $22\pm 2^\circ\text{C}$.

Раствор №1 (ФСР–Т) — для промывания планшета. Концентрат ФСР–Т в количестве 10,0 мл разводят дистиллированной водой до конечного объема 0,25л. Раствор хранят при температуре $6\pm 2^\circ\text{C}$ не более 3 суток.

Раствор №2 (блок-раствор) — для разведения исследуемых сывороток. Раствор готов к применению. Содержимое флакона с Блок-раствором тщательно перемешивают. Оставшийся неиспользованным реагент хранят при температуре $6\pm 2^\circ\text{C}$ на протяжении срока годности тест-системы.

Раствор №3 (солевой раствор) — для разведения конъюгата. Раствор готов к применению. Содержимое флакона тщательно перемешивают. Оставшийся неиспользованным реагент хранят при температуре $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ на протяжении срока годности тест-системы.

Раствор №4 (конъюгат). Чистым наконечником отобрать из флакона 0,2 мл концентрата конъюгата и развести добавлением 2,0 мл раствора №3 (солевой раствор). Раствор готовят перед использованием — хранению не подлежит.

Раствор №5 (субстратная смесь). Отобрать в чистый флакон 5,0 мл СБ. 0,5 мл ТМБ растворяют в 5,0 мл СБ и тщательно перемешивают. Раствор готовят перед использованием, т.к. хранению не подлежит.

Посуду, наконечники пипеток, ванночки для растворов, которые контактируют с раствором ТМБ, нельзя отмывать синтетическими моющими средствами, так как даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции.

II. Проведение иммуноферментного анализа

При проведении анализа в 2-х стрипах или нескольких стрипах, неиспользуемые стрипы иммуносорбента необходимо удалить из рамки и хранить в плотно закрытом (лучше в фольгированном) пакете при температуре $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ на протяжении срока годности тест-системы.

В данной методике перед использованием иммуносорбент не промывают!

1. В 3 лунки иммуносорбента заливают по 100 мкл K^- , в 1 лунку — 100 мкл K^+ . В остальные лунки вносят по 30 мкл раствора №2 (блок-раствор) и по 70 мкл образцов исследуемых сывороток. Содержимое лунок тщательно перемешивают осторожным постукиванием по краям планшета. Планшет закрывают крышкой и выдерживают 60 мин при температуре $37\pm 2^{\circ}\text{C}$. Неиспользованные K^+ и K^- можно хранить при температуре $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ на протяжении срока годности тест-системы.

2. Содержимое лунок отсасывают в сосуд с 5–6% раствором монохлорамина и стрипы отмывают 4 раза раствором №1 (ФСР–Т), заполняя лунки до краев (не менее 350 мкл), при объеме ячейки 340–350 мкл, выдерживая по 40–60 секунд (экспозиция) и отсасывая промывающий раствор в сосуд с монохлорамином. После промывки в лунках не должно оставаться жидкости. При необходимости можно осушить лунки, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

3. Во все лунки используемых стрипов планшета вносят по 100 мкл раствора №4 (конъюгат). Планшет закрывают крышкой и выдерживают 30 мин при температуре $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$.

4. Содержимое лунок удаляют и планшет промывают 4 раза как в п.2.

5. Во все лунки стрипов вносят по 100 мкл раствора №5 (суб-

стратная смесь) и покрытый крышкой планшет инкубируют 25–30 мин в защищенном от света месте при температуре $22 \pm 2^\circ \text{C}$.

6. Реакцию останавливают добавлением во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и немедленно проводят учет результатов.

III. Учет результатов

Учет результатов проводят спектрофотометрически на планшетном фотометре предпочтительно при двух длинах волн 450 нм и 620–680 нм. Можно учитывать результаты и при одной длине волны 450 нм. Настройку прибора проводят «по воздуху». Реакцию учитывают, если средние значения оптической плотности (ОП) в лунках с K^- не более 0,2 оптической единицы, а в лунках с K^+ не ниже 1,5 о.е. Каждое отдельное значение ОП K^- не должно отличаться от среднего значения более, чем на 30%. Если одно из 3-х значений ОП K^- выходит за пределы этой величины, его следует исключить из расчета среднего значения. Результаты анализа сывороток на присутствие анти-ВГС считают положительными, если значение ОП исследуемого образца выше критического (ОП Крит.).

ОП крит. рассчитывают по формуле:

$$\text{ОП крит.} = \text{Ср. знач. ОП К}^- + 0,18,$$

где 0,18 — коэффициент, установленный методом статистической обработки результата на предприятии-изготовителе. Положительно реагирующие образцы исследуются повторно в ИФА. Если хотя бы один из повторных анализов дает положительный результат, образец считают положительным. При отрицательных результатах повторного исследования образец считается отрицательным. Все положительные образцы должны быть исследованы в подтверждающих ИФА-тестах, иммуноблотинге и методом ПЦР.

Вывод делают на основании полученных результатов. По предложенной схеме документирования результатов ИФА оформляют протокол, включая протокол серологического исследования.

По окончании выполнения работы производят уборку и обработку рабочих поверхностей, используя дезинфицирующие растворы (обработка поверхности столов, оборудования, посуды, пипеток), все использованные материалы подвергают обработке такими дезинфицирующими растворами как 6%-ный раствор перекиси водорода или 3%-ный раствор монохлорамина; использованные наконечники обрабатывают 20%-ным раствором этилового спирта.

Записи производят в журнале исследований и журналах по использованию оборудования в лаборатории.

4.10. Исследование сыворотки крови на наличие антител к вирусу гепатита С

Тест-система предназначена для специфической диагностики вирусного гепатита С путем определения анти-НСV класса IgG в сыворотке или плазме крови человека.

При работе необходимо соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом.

Цель работы: специфическая диагностика вирусного гепатита С путем определения анти-НСV класса IgG в сыворотке крови (или плазме) человека.

Материалы и оборудование: набор тест-системы иммуноферментной для выявления антител к вирусу гепатита С (с достаточным сроком годности); средства индивидуальной защиты — халат, очки, маска, перчатки; дистиллированная вода, 6%-ная перекись водорода; 3%-ный раствор 3% монохлорамина; 20%-ный раствор этилового спирта; 70%-ный спирт этиловый; вата гигроскопическая; фильтровальная бумага; пипетки одноканальные (5–40, 20–200, 200–1000 мкл) и наконечники к ним; пипетки 8-канальные (50–300 мкл) и наконечники к ним; стаканы для приготовления растворов, мерный стакан и цилиндр (1000 мл); штатив; пробирки; ванночки для реагентов; флаконы для реактивов 20 мл; суховоздушный термостат на 37°C; автоматический промыватель планшетов (вошер); фотометр (АИФ) для измерения оптической плотности в планшете; контейнер для сбора твердых загрязненных отходов; контейнер для слива отработанных загрязненных жидкостей и свежеприготовленные дезинфицирующие растворы; карта-схема расстановки сывороток в штативе. Объект исследования — сыворотка (или плазма) крови человека.

Ход работы

Выполнение работы следует проводить только после тщательного изучения инструкции к набору, где могут быть сделаны пометки.

В состав набора тест-системы входят иммуносорбент содержащий рекомбинантные антигены вируса гепатита С (НСVAg): структурные вирусные белки-мозаичный core-белок, фрагмент core-белка и фрагменты неструктурных белков — NS3, NS4A–NS4B, NS4B и NS5, сорбированные на полистироловом планшете; конъюгат анти-IgG человека с пероксидазой хрена (11-кратный концерт); положительный контрольный образец — K⁺ — сыворотка крови человека, содержащая антитела к вирусу гепатита С (анти-НСV) в разведении 1:2, инактивированная прогреванием; отрицательный контрольный образец — K⁻ —

сыворотка крови человека, не содержащая анти-НСV в разведении 1:2. Блок-раствор для разведения исследуемых сывороток; солевой раствор для разведения конъюгата; фосфатно-солевой раствор с твином-80 (ФСР-Т, 25-кратный концентрат); субстратный буферный раствор (СБ); хромоген — тетраметилбензидин (ТМБ); стоп-реагент — серная кислота в концентрации 1 моль/л.

Набор рассчитан на проведение 88 анализов на присутствие анти-НСV без учета контрольных. Компоненты тест-системы — концентраты конъюгата и ФСР-Т, K^+ и K^- — бесцветные или желтоватого цвета жидкости, прозрачные или слегка опалесцирующие, блок-раствор может быть голубого цвета, K^+ может быть красно-оранжевого, а K^- — зеленого цвета, в концентрате ФСР-Т допускается выпадение осадка, растворяющегося при его разведении; солевой раствор, СБ, ТМБ и стоп-реагент — прозрачные бесцветные жидкости; рН ФСР-Т и блок-растворов — 7,0–7,5, СБ — 4,8–5,0.

I. Для проведения работы необходимо подготовить реагенты:

Приготовление растворов

Раствор №1 (ФСР-Т) — для промывания планшета. Содержимое флакона с концентратом ФСР-Т разводят дистиллированной водой до конечного объема 0,5л. Хранят при температуре $6\pm 2^\circ\text{C}$ не более 3 суток.

Раствор №2 (блок-раствор) — для разведения исследуемых сывороток. Раствор готовый. Содержимое флакона с блок-раствором тщательно перемешивают. Открытый флакон с блок-раствором хранят при температуре $6\pm 2^\circ\text{C}$ не более 1-х суток.

Раствор №3 (солевой раствор) — для разведения концентрата конъюгата. Раствор готовый. Условия хранения аналогичны приведенным для блок-раствора.

Раствор №4 (конъюгат). Содержимое флакона с концентратом конъюгата разводят добавлением 10,0 мл раствора №3. Раствор готовят перед использованием, т.к. хранению не подлежит.

Раствор №5 (субстратная смесь) 1,0 мл. ТМБ растворяют в 10,0 мл СБ и содержимое флакона тщательно перемешивают. Раствор готовят перед использованием, т.к. хранению не подлежит.

Субстратная смесь должна быть бесцветной!

Подготовка исследуемых образцов

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Каж-

дый образец сыворотки отбирать чистым наконечником. Отобранные образцы хранят при температуре $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ не более 74 ч.

Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 15°C с исключением возможности многократно оттаивания-замораживания (не более 1 раза).

Ложные результаты могут быть получены с образцами с выраженным гемолизом и гиперлипидемией.

Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлять центрифугированием.

II. Проведение иммуноферментного анализа

В данной методике перед использованием иммуносорбент не промывают!

1. В 2 лунки иммуносорбента вносят по 100 мкл раствора №1 (контроли конъюгата), в 4 другие лунки — по 100 мкл K^{-} и в 2 лунки — по 100 мкл K^{+} . В остальные лунки закапывают по 50 мкл раствора №2 и по 50 мкл образцов исследуемых сывороток (разведение сывороток в два раза). Содержимое лунок тщательно перемешивают осторожным постукиванием по краям планшета. Планшет закрывают крышкой и выдерживают 60 мин в термостате при температуре $37\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Неиспользованные контроли K^{+} и K^{-} хранят при температуре $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ на протяжении срока годности тест-системы.

2. Содержимое лунок отсасывают в сосуд с 5–6%-ным раствором хлорамина и стрипы отмывают 4 раза раствором №1, заполняя лунки до краев и отсасывая промывающий раствор в сосуд с хлорамином.

3. Во все лунки планшета вносят по 100 мкл раствора №4. Планшет закрывают крышкой и выдерживают 30 мин при температуре $37\pm 2^{\circ}\text{C}$.

4. Содержимое лунок отсасывают и планшет промывают 4 раза как в п.2.

5. Во все лунки отмытого планшета вносят по 100 мкл раствора №5 и покрытый крышкой планшет инкубируют 30 минут в защищенном от света месте при температуре $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.

6. Реакцию останавливают добавлением во все лунки по 50 мкл стор-реагента и немедленно проводят учет результатов.

III. Учет результатов.

Осуществляют спектрофотометрически на плащечном фотометре предпочтительно при двух длинах волн 450 нм и 620 нм. Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм с настройкой прибора «по воздуху». Реакцию учитывают, если средние значения оптиче-

ской плотности (ОП) в лунках с K^- и контролем конъюгата не более 0,25 оптической единицы, а в лунках с K^+ — не менее 1,0 о.е.

Каждое отдельное значение ОП K^- не должно отличаться от среднего значения более, чем на 30%. Если одно из 4-х значений ОП K^- выходит за пределы этой величины, его следует исключить из расчета среднего значения. Если ОП исследуемого образца равна или выше критической (ОП_{крит.}), то образец рассматривается как положительно реагирующий. ОП_{крит.} рассчитывают по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит}} = \text{Ср.знач. ОП } K^- + 0,18,$$

где 0,18 — коэффициент, установленный методом статистической обработки результатов на предприятии-изготовителе. Положительно реагирующие образцы исследуются повторно в данном тесте не менее, чем в двух лунках. Если хотя бы один из повторных анализов дает положительный результат, образец считают положительным. При отрицательных результатах повторного исследования образец считается отрицательным. Все положительные образцы должны быть исследованы в подтверждающих ИФА-тестах (предпочтительно «ИФА-АНТИ-НСV-СПЕКТР»), или в иммуноблоттинге, или в ПЦР.

Вывод делают на основании полученных результатов. По предложенной схеме документирования результатов ИФА оформляют протокол, включая протокол серологического исследования.

По окончании выполнения работы производят уборку и обработку рабочих поверхностей, используя дезинфицирующие растворы (обработка поверхности столов, оборудования, посуды, пипеток), все использованные материалы подвергают обработке такими дезинфицирующими растворами как 6%-ный раствор перекиси водорода или 3%-ный раствор монохлорамина; использованные наконечники обрабатывают 20%-ным раствором этилового спирта.

Записи производят в журнале исследований и журналах по использованию оборудования в лаборатории.

4.11. Исследование сыворотки крови с целью идентификации спектра антител класса IgG к вирусу гепатита С и подтверждения результатов анти-НСV скрининга

Тест-система предназначена для выявления спектра IgG-антител к вирусу гепатита С в сыворотке и плазме крови людей иммуноферментным методом.

При работе необходимо соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом.

Цель работы: выявить спектр IgG-антител к вирусу гепатита С в сыворотке и плазме крови людей иммуноферментным методом для дифференциальной диагностики, оценки тяжести течения и прогноза заболевания, а также подтверждения положительных или сомнительных результатов анти-НСV скрининга.

Материалы и оборудование: набор тест-системы иммуноферментной для выявления спектра антител класса IgG к вирусу гепатита С (с достаточным сроком годности); средства индивидуальной защиты — халат, очки, маска, перчатки; дистиллированная вода, 6%-ная перекись водорода; 3%-ный раствор монохлорамина; 20%-ный раствор этилового спирта; 70%-ный спирт этиловый; вата гигроскопическая; фильтровальная бумага; пипетки одноканальные (5–40, 20–200, 200–1000 мкл) и наконечники к ним; пипетки 8-канальные (50–300 мкл) и наконечники к ним; стаканы для приготовления растворов, мерный стакан и цилиндр (1000 мл); штатив; пробирки; ванночки для реагентов; флаконы для реактивов, 20 мл; суховоздушный термостат на 37°C; автоматический промыватель планшетов (вошер); фотометр (АИФ) для измерения оптической плотности в планшете; контейнер для сбора твердых загрязненных отходов; контейнер для слива отработанных загрязненных жидкостей и свежеприготовленные дезинфицирующие растворы; карта-схема расстановки сывороток в штативе. Объект исследования — сыворотка (или плазма) крови человека.

Ход работы

Набор тест-системы включает: иммуносорбент — рекомбинантные антигены вируса гепатита С: мозаичный core-белок, фрагмент core-белка (НСV-core-Ag) и фрагменты неструктурных белков NS3, NS4B, NS4A-NS4B и NS5 (НСV-NS-Ag), отдельно сорбированные на стрипах полистиролового разборного планшета: на 3-х стрипах сорбированы НCV-core-Ag, на 3-х стрипах — НCV-NS3-Ag, на 3-х стрипах — НCV-NS4-Ag (NS4B+ NS4A-NS4B) и на 3-х стрипах — НCV-NS5-Ag; стрипы иммуносорбента сформированы в три, отдельно упакованных блока, каждый из которых включает 4 стрипа с перечисленными выше НCV-Ag; конъюгат анти-IgG человека с пероксидазой хрена (11-кратный концентрат); положительный контрольный образец — K^+ — сыворотка крови человека в разведении 1:2, содержащая IgG антитела к структурным и неструктурным белкам вируса гепатита С (анти-НСV), инактивированный; отрицательный контрольный образец — K^- — сыворотка крови человека в разведении 1:2, не содержащая анти-НСV, блок-раствор для разведения исследуемых сывороток; раствор для разведе-

ния концентрата конъюгата; фосфатно-солевой раствор с твином-20 (ФСР-Т, 25-кратный концентрат); субстратный буферный раствор (СБ); 3,3, 5,5-тетраметилбензидин (ТМБ) и стоп-реагент (серная или соляная кислоты концентрации 1 моль/л).

pH ФСР-Т, раствора для разведения концентрата конъюгата и блок-раствора 7,5–7,9, СБ — 4,8–5,0.

I. Для проведения работы необходимо подготовить реагенты.

Приготовление растворов

Пример приготовления растворов рассчитан на проведение анализа на 4-х стрипах.

Раствор №1 (ФСР-Т) — для промывания планшетов. Содержимое флакона с концентратом ФСР-Т разводят дистиллированной водой до конечного объема 0,5 л. Раствор хранят при температуре $6\pm 2^\circ\text{C}$ не более 3 суток.

Раствор №2 (конъюгат). Содержимое флакона с концентратом конъюгата разводят добавлением 3,5 мл раствора для его разведения. Раствор готовят перед использованием, т.к. хранению не подлежит.

Раствор №3 (субстратная смесь) 0,5 мл ТМБ переносят во флакон с 5,0 мл СБ. Раствор готовят перед использованием, т.к. хранению не подлежит.

Субстратная смесь должна быть бесцветной

Подготовка исследуемых образцов

Образцы с бактериальным проростом, а также с выраженным гемолизом и гиперлипидемией анализу не подлежат! Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлять центрифугированием. Отобранные образцы сывороток хранят при температуре $6\pm 2^\circ\text{C}$ не более 48 часов. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 15°C с исключением многократного оттаивания-замораживания (не более 1 раза). Каждый образец сыворотки или раствор необходимо отбирать чистым наконечником.

II. Проведение иммуноферментного анализа

Перед использованием стрипы иммуносорбента промывают 4 раза раствором №1.

1. В лунки 1–4 ряда А вносят по 100 мкл K^+ , в лунки 1,2,3,4 ряда В и С — по 100 мкл K^- . В остальные лунки, предназначенные для исследования образцов сывороток закапывают по 50 мкл блок-раствора и по 50 мкл образцов сывороток (разведение сывороток в лунках в 2 раза). Исследуемый образец вносят в 4 лунки иммуносорбенты для проведе-

ния анализа с каждым антигеном: с HCV-core-Ag, HCV-NS3-Ag, HCV-NS4-Ag и HCV-NS5-Ag (лунки 1–4, 5–8 и 9–12 в соответствии с приведенной картой-схемой постановки ИФА в приложении). Планшет закрывают крышкой и выдерживают 60 мин в термостате при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

2. Содержимое лунок отсасывают в сосуд, наполовину заполненный 5–6%-ным раствором хлорамина, и планшет отмывают 4 раза растворами №1, заполняя лунки до краев и отсасывая ФСП-Т в сосуд с хлорамином.

3. Во все лунки планшета вносят 100 мкл раствора №2 и закрытый крышкой планшет выдерживают 30 мин в термостате при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$, после чего отмывают 4 раза, как указано в п.2.

4. Во все лунки планшета вносят по 100 мкл раствора №3 и покрытый крышкой планшет выдерживают 30 мин при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ в защищенном от света месте.

5. Реакцию останавливают добавлением во все лунки планшета по 50 мкл стоп-реагента и немедленно производят учет результатов.

III. Учет результатов

Учет результатов осуществляется спектрофотометрически на планшетном фотометре (или приборе АИФ М340) предпочтительно при 2-х длинах волн 450 и 620–680 нм. Допустим учет результатов при одной длине волны 450 нм с настройкой прибора «по воздуху». Реакцию учитывают, если значение ОП в лунках с K^+ не менее 1,0 оптической единицы, а в лунках с K^- среднее значение ОП не выше 0,3 о.е. Учет результатов анализа сывороток на анти-HCV-core-Ag, HCV-NS3-Ag, HCV-NS4-Ag и HCV-NS5-Ag проводят отдельно. Результаты анализа считают положительными, если значение ОП образца в лунках хотя бы с одним из сорбированных антигенов превышает соответствующее ОП критическое ($ОП_{\text{крит.}}$).

$ОП_{\text{крит.}}$ рассчитывают по формулам:

$$ОП_{\text{крит. NS3-Ag}} = \text{Ср.знач. ОП } K^- (\text{NS3}) + 0,2;$$

$$ОП_{\text{крит. NS4-Ag}} = \text{Ср.знач. ОП } K^- (\text{NS4}) + 0,2;$$

$$ОП_{\text{крит. NS5-Ag}} = \text{Ср.знач. ОП } K^- (\text{NS5}) + 0,2,$$

где 0,2 — коэффициенты, полученные методом статистической обработки результатов на предприятии-изготовителе.

Если исследуемый образец дает положительную реакцию на антигена только к одному из HCV-Ag, со значением ОП, равным или

превышающим значение $ОП_{крит.}$ не более, чем на 20%, или реагирует с 2-мя и более HCV-Ag с $ОП$ ниже $ОП_{крит.}$, но не более, чем на 20%, требуется повторное исследование сыворотки на анти- HCV-антитела через 2–3 недели от момента первого отбора крови. В случае аналогичных результатов при повторном исследовании в динамике считать реакцию на анти-HCV отрицательной.

Вывод делают на основании полученных результатов. По предложенной схеме документирования результатов ИФА оформляют протокол, включая протокол серологического исследования.

По окончании выполнения работы производят уборку и обработку рабочих поверхностей, используя дезинфицирующие растворы (обработка поверхности столов, оборудования, посуды, пипеток), все использованные материалы подвергают обработке такими дезинфицирующими растворами как 6%-ный раствор перекиси водорода или 3%-ный раствор монохлорамина; использованные наконечники обрабатывают 20%-ным раствором этилового спирта.

Записи производят в журнале исследований и журналах по использованию оборудования в лаборатории.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенные в учебно-методическом пособии рекомендации по организации выполнения метода иммуноферментного анализа помогут обеспечить качество лабораторных исследований, а именно, предупредить внелабораторные и внутрिलाбораторные ошибки.

Описанные методики определения антигенов вирусов гепатитов и антител к ним направлены на формирование умений системно планировать работу по выполнению иммуноферментного анализа, а также организовывать на высоком профессиональном уровне проведение исследований в целом.

Выявление с высокой точностью вирусной инфекции методом ИФА, а также методом ПЦР, необходимо при проведении превентивных мероприятий и антивирусной терапии.

Гипердиагностика ИФА-систем исключается благодаря использованию динамической оценки на основе индикации, например анти-НСV к дискретным антигенам (подтверждающие, или подтверждающие тесты). Существенно повышается и информативность исследований при оценке характеристики спектра антител к отдельным белкам, особенно в условиях динамического контроля. С этой целью используют иммуноблотинг или иммуноферментные тесты с отдельно сорбированными на планшетах антигенами вируса гепатита. Разработанная тест-система «ИФА АНТИ НСV СПЕКТР», которая является альтернативой иммуноблотингу, позволяет учесть изменения соотношения антител к разным антигенам НСV в разные сроки заболевания.

Тест-системы иммуноферментные используются в службе переливания крови, центрах по борьбе и профилактике СПИДа, центрах гемодиализа, инфекционных больницах, центрах санитарно-эпидемиологического надзора, диагностических лабораториях, где осуществляется ранняя диагностика вирусных гепатитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Жаворонок, С. В.* Принципиальная схема твердофазного иммуноферментного анализа: учеб. пособие / С. В. Жаворонок, Д. В. Талпальский. — Гомель : УО «Гомельский государственный медицинский университет», 2004. — С. 25.

2. *Коротяев, А. И.* Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед.вузов / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев; под ред. А. И. Коротяева. — 3-е изд., испр. и доп. — СПб. : Спецлит, 2002. — 591с.

3. Оценка системы контроля качества детекции HBsAg в сети скрининговых лабораторий / Кузин С.Н. [и др.] // Журн. микробиол. 2002. — №3. — С.52–56.

4. *Залеских, Н. В.* Система внешнего и внутреннего контроля качества в иммуноферментном анализе / Информационные материалы Н. В. Залеских, М. Н. Кокорева, А. Н. Сивилева. — Н. Новгород : НПО «Диагностические системы», 2003. — С. 40.

5. Инструкция по применению тест-системы иммуноферментной для определения антител класса IgM к вирусу гепатита А (enzyme immunoassay test-system for the detection IgM-antibodies to hepatitis A virus): Мн-0.439-9812: Утв. зам. Министра здравоохранения РБ: Срок действия установлен с 1998 г./ Министерство здравоохранения РБ. — НИИ Эпидемиологии и микробиологии. — Мн., 1998. — 2 с.

6. Инструкция по применению тест-системы иммуноферментной для выявления антител к HBc-антигену вируса гепатита В (комплект №1 ИФА-анти-HBc HEPAVIR-B (anti-HBc)): Утв. ученым советом НИИЭМ им. Пастера: Срок действия установлен с 27.12.2000г. — СПб., 2000. — 4 с.

7. Инструкция по применению тест-системы иммуноферментной для выявления IgM-антител к вирусу гепатита Дельта (комплект №1 ИФА-анти-ВГД-М HEPAVIR-D (anti-HDV-M): Утв. ученым советом НИИЭМ им. Пастера : Срок действия установлен с 27.12.2000 г. — СПб., 2000. — 4 с.

8. Инструкция по применению тест-системы иммуноферментной для выявления антител к HBe-антигену вируса гепатита В (комплект №1 ИФА-анти-HBe HEPAVIR-B (anti-HBe): Утв. ученым советом НИИЭМ им. Пастера: Срок действия установлен с 27.12.2000 г. для исследований. — СПб., 2000. — 4 с.

9. Инструкция по применению тест-системы иммуноферментной для выявления HBe-антигена вируса гепатита В (комплект №1 ИФА-

Нве-антиген НЕРАVIR-B (Нве-Ag)[®]): Утв. ученым советом НИИЭМ им. Пастера 27.12.2000 г. — СПб., 2000 — 4 с.

10. Инструкция по использованию тест-системы иммуноферментной «DIA-НВV»: Сертификат гос.рег. иммунобиологического препарата № 275/01-3002 00 000: ФС 42У-200-121-1223-01, ОАЗТ НПК «ДиаПроф Мед», г. Киев, 2001. — 2 с.

11. Инструкция по использованию тест-системы иммуноферментной «DIA-C-НВV»: Сертификат гос.рег. иммунобиологического препарата № 274/01-3002 00 000: ФС 42У-200-121-1225-01, ОАЗТ НПК «ДиаПроф Мед», г. Киев., 2001. — 2 с.

12. Инструкция по применению тест-системы иммуноферментной для выявления антител к вирусу гепатита С («ВГС-КОНТРОЛЬ»): Утв. зам. Министра здравоохранения РБ: Срок действия установлен с 24.04.2003г., НПООО «ММС». — Мн., 2003 — 2 с.

13. Соринсон, С. Н. Вирусные гепатиты / С. Н. Соринсон. — СПб., 1998.

14. Балаян, М. С., Энциклопедический словарь — вирусные гепатиты / М. С. Балаян, М. И. Михайлов. — М., 1999.

15. Алгоритм специфической лабораторной диагностики вирусных гепатитов в условиях стационара/ И. А. Симонова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 2000. — №8. — С. 21–33.

16. Инструкция диагностической иммуноферментной тест-системы «РекомбиБест анти-ВГС — стрип», ЗАО «Вектор-Бест», п. Кольцово Новосибирской обл., федеральная лицензия № 42/055/2001, 2003. — 13 с.

17. Диагностика гепатита С / А. Н. Маянский [и др.]. Информационные материалы. — Н. Новгород: НПО «Диагностические системы», 2004. — 47 с.

18. Rizetto, M., Ponzetto A., Forzani J. // Vaccine. — 1990. — Vol. 8, № 3. — P. 10–14.

19. Mushahwaar, I. K. [et al.] // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. — 1996. — Vol. 8, № 4. — P. 312–318.

20. Greiner, M. A modified ROC analysis for the selection of Cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic test / M. Greiner, D. Sohr, P. Gobel // J. immunol. Meth. — 1995. — Vol. 185 — P. 123–132.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

1. Документирование результатов иммуноферментного анализа

Для работы предлагается один из возможных вариантов записи протокола проведения ИФА, который оптимизирует работу, обеспечивая точность и сокращая время на оформление.

СХЕМА ПРОТОКОЛА

Протокол №

1. Дата проведения исследования.
2. Место проведения исследования.
3. Название работы.
4. Цель работы.
5. Материалы и оборудование.
6. Ход работы.

Описывают ход работы. К протоколу исследования подклеивают карту-схему проведения ИФА (где отмечены контроли тест-системы и записаны номера, присвоенные исследуемым образцам сывороток), инструкцию используемой тест-системы и распечатку учета результатов.

7. Выводы делают на основании полученных результатов.

2. Протокол серологического исследования

Пример оформления протокола серологического исследования в ЦНИЛ медицинского университета.

ПРОТОКОЛ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Набор тест-системы: Серия 31 Годен до 12.07.2006 г.
Дата проведения ИФА 2.03.2006 г. ИФА на HBsAg

Таблица А. 1 — Карта-схема

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
A	Blank	4	12	20	28	36	9	363	409	500	589	703
B	K ⁻	5	13	21	29	37	97	364	411	505	591	805
C	K ⁻	6	14	22	30	38	134	395	425	525	593	887
D	K ⁺	7	15	23	31	39	198	399	430	565	595	914
E	K ⁺	8	16	24	32	40	243	402	431	571	597	978
F	1	9	17	25	33	41	304	403	438	573	599	1340
G	2	10	18	26	34	42	311	405	441	578	634	1367
H	3	11	19	27	35	43	362	406	442	580	635	1412

Учет контролей _____

Результаты исследования _____

Вывод _____

Врач-лаборант (или научный сотрудник): Ф.И.О. (подпись)

Лаборант: Ф.И.О. (подпись)

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», ЦНИЛ

Варианты заполнения карты-схемы зависят от задачи исследования и соответствует требованиям тест-системы.

Например, при использовании тест-системы иммуноферментной для идентификации спектра антител класса IgG к вирусу гепатита С и подтверждения результатов анти-НСV скрининга «ИФА-АНТИ-НСV-СПЕКТР» карту-схему заполняют следующим образом:

Таблица А. 2 — Карта-схема

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
	core	NS3	NS4	NS5	core	NS3	NS4	NS5	core	NS3	NS4	NS5
A	K ⁺	K ⁺	K ⁺	K ⁺	6	6	6	6	14	14	14	14
B	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	7	7	7	7	15	15	15	15
C	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	8	8	8	8	16	16	16	16
D	1	1	1	1	9	9	9	9	17	17	17	17
E	2	2	2	2	10	10	10	10	18	18	18	18
F	3	3	3	3	11	11	11	11	19	19	19	19
G	4	4	4	4	12	12	12	12	20	20	20	20
H	5	5	5	5	13	13	13	13	21	21	21	21

3. Наименование и краткое описание тест-систем иммуноферментных, используемых для выявления антигенов вирусов гепатита и антител к ним

1. Тест-система иммуноферментная для определения антител класса IgM к вирусу гепатита А, НИИ Эпидемиологии и микробиологии РБ.

2. Вектогеп А-IgM-стрип (ВФС 42-331 ВС-92), тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита А с использованием моноклональных антител (время инкубации — 2,5 часа, число определений 4×24 анализа, номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» — D-0302).

3. Вектогеп А-антиген-стрип, тест-система иммуноферментная для выявления антигена вируса гепатита А (число определений 4×24 анализа, номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» — D-0306).

4. Вектогеп А-антитела—стрип (ВФС 42/Д-016ВС-95), тест-система иммуноферментная для выявления суммарных антител к вирусу гепатита А (время инкубации — 1 час, число определений 12×8 анализов, номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» — D-0312).

5. Вектогеп А-РНК-дот-спот, тест-система гибридизационная для выявления РНК вируса гепатита А с использованием дот-ячейки (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0309*).

6. Вектогеп А-РНК-спот, тест-система гибридизационная для выявления РНК вируса гепатита А без использования дот-ячейки (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0310*).

7. Стандартная панель сывороток, содержащих иммуноглобулины класса М к вирусу гепатита А, применяется для оценки чувствительности тест-систем, выявляющих антитела к вирусу гепатита А (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0313*).

8. Рекоматгеп В (ФС 42-416ВС-93), 192 анализа (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0501).

9. Рекоматгеп В-стрип (ФС 42-416ВС-93), 3×32 анализа (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0502).

10. Рекоматгеп В-подтверждающий тест-стрип (ФС 42-416ВС-93), тест-система для подтверждения присутствия HBs-антигена методом конкурентного иммуноферментного анализа, 3×16 анализов (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0504).

11. Вектогеп В-HBs-антиген (ФС 42-422ВС-93), 192 анализа (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0505).

12. Вектогеп В-HBs-антиген-стрип (ФС 42-422ВС-93), тест-система иммуноферментная для определения HBs-антигена с использованием рекомбинантного антигена и моноклональных антител (время инкубации — 1 час, 12×8 анализов), (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0506).

13. Вектогеп В-HBs-антиген-подтверждающий тест-стрип (ФС 42-422ВС-93), тест-система для подтверждения присутствия HBs-антигена методом конкурентного иммуноферментного анализа антител (время инкубации — 1 час, 3×16 анализов), (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0508).

14. ВектоHBsAg-антитела-стрип, тест-система иммуноферментная для выявления антител к HBs-антигену с использованием рекомбинантного антигена (12×8 анализов), (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0512).

15. ВектоHBsAg-IgM-стрип (ВФС 42-349ВС-92), тест-система им-

муноферментная для выявления иммуноглобулинов класса М к кор-антигену вируса гепатита В (4×24 анализа), (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0514).

16. ВектоНВсAg-антитела-стрип (ВФС 42-251ВС-90), тест-система иммуноферментная для выявления суммарных антител к кор-антигену вируса гепатита В (4×24 анализа), (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0516).

17. ГепаБест анти-НВс-IgG-стрип, тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса G к кор-антигену вируса гепатита В (4×24 анализа), (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0524).

18. ВектоНВе-антиген-стрип, тест-система иммуноферментная для выявления E-антигена вируса гепатита В (12×8 анализов), (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0526).

19. ВектоНВе-IgG-стрип, тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса G к E-антигену вируса гепатита В (12×8 анализов), (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0528).

20. РекомбиБест анти-ВГС (ФС 42-3157-95), 192 анализа (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0701).

21. РекомбиБест анти-ВГС-стрип (ФС 42-3157-95), тест-система иммуноферментная для выявления антител к вирусу гепатита С с использованием рекомбинантных белков (3×32 анализа), (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0702).

22. РекомбиБест анти-ВГС подтверждающий тест (ФС 42-3157-95), тест-система иммуноферментная для подтверждения наличия антител к вирусу гепатита С с использованием рекомбинантных белков (48 анализов), (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0706).

23. Стандартная панель сывороток на антитела к вирусу гепатита С, применяется для оценки чувствительности и специфичности тест-систем, выявляющих антитела к вирусу гепатита С (24 по 200 мкл), (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0707).

24. РекомбиБест анти-ВГС-IgM-стрип, тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита С (6×16 анализов), (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0710).

25. Вектогеп Д-IgM-стрип, тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита Д (Дельта-инфекция), 12×8 анализов, (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0902).

26. Вектогеп Д-антитела-стрип, тест-система иммуноферментная для выявления суммарных антител к вирусу гепатита Д (Дельта-инфекция), 4×24 анализа, (номер по каталогу продукции ЗАО «Вектор-Бест» D-0902).

27. «ИФА АНТИ HCV», тест-система иммуноферментная для выявления антител класса IgG к вирусу гепатита С (ФС 42 3438-97); «ИФА-АНТИ- HCV»* — для выявления антител классов IgG и IgM к вирусу гепатита С, НПО «Диагностические системы».

28. «ИФА АНТИ HCVc-M» — для выявления антител класса IgM к вирусу гепатита С ФСП 42-00990934-01, НПО «Диагностические системы».

29. «ИФА АНТИ HCV спектр» — для идентификации спектра антител класса IgG и к вирусу гепатита С и подтверждения результатов анти-HCV скрининга (ВФС 423590-99), НПО «Диагностические системы».

30. «ИФА АНТИ HCV спектр GM» — для идентификации спектра антител классов IgG и IgM к вирусу гепатита С и подтверждения результатов анти HCV скрининга с использованием «ИФА АНТИ HCV»* , НПО «Диагностические системы».

4. Перечень тест-систем для выявления антигенов вирусов гепатита и антител к ним, зарегистрированных в системе Министерства здравоохранения РФ

1. Тест-система иммуноферментная для выявления поверхностного антигена (HBsAg) вируса гепатита В «DIA-HBV».

2. Тест-система иммуноферментная для подтверждения наличия поверхностного антигена (HBsAg) вируса гепатита В «DIA-C-HBV».

3. Тест-система иммуноферментная для определения антител к вирусу гепатита С «DIA-HCV».

4. Тест-система иммуноферментная для определения антител к вирусу гепатита В «DIA-HBscore».

5. Вектогеп В-HBs-антиген-стрип (ФС 42-422BC-93), тест- система иммуноферментная для определения HBs-антигена с использованием рекомбинантного антигена и моноклональных антител, ЗАО «Вектор-Бест».

6. Вектогеп В-HBs-антиген-подтверждающий тест-стрип (ФС 42-422BC-93), тест-система для подтверждения присутствия HBs-антигена методом конкурентного система иммуноферментного анализа антител, ЗАО «Вектор-Бест».

7. Вектогеп В-HBs-антиген, ЗАО «Вектор-Бест».

8. ВектоHBsAg-антитела-стрип, тест-система система иммуноферментная для выявления антител к HBs-антигену с использованием рекомбинантного антигена, ЗАО «Вектор-Бест».

9. ВектоHBcAg-IgM-стрип, тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса М к кор-антигену вируса гепатита В, ЗАО «Вектор-Бест» D-0514).

10. Тест-система иммуноферментная для выявления антител к HBc-антигену вируса гепатита, НИИЭМ им. Пастера — Санкт-Петербург.

11. Тест-система иммуноферментная для выявления IgM-антител к вирусу гепатита Дельта (комплект №1 ИФА-анти-ВГД-М HEPAVIR-D (anti-HDV-M), НИИЭМ им. Пастера, — Санкт-Петербург.

12. Тест-система иммуноферментная для выявления антител к HBe-антигену вируса гепатита В (комплект №1 ИФА-анти-HBe HEPAVIR-B (anti-HBe): НИИЭМ им. Пастера, — Санкт-Петербург.

13. Тест-система иммуноферментная для выявления HBe-антигена вируса гепатита В (комплект 1 ИФА-HBe-антиген HEPAVIR-B (HBe-Ag)®), НИИЭМ им. Пастера, — Санкт-Петербург.

14. Тест-система иммуноферментная «DIA-HBV», ОАЗТ НПК «ДиаПроф Мед», г. Киев.

15. Тест-система «РекомбиБест анти-ВГС—стрип», ЗАО «Вектор-Бест», п. Кольцово Новосибирской обл.

Учебное издание

Автор: Алла Стефановна Рудницкая

**ОСНОВНЫЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИММУНОФЕРМЕНТНОМУ АНАЛИЗУ
ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ
ВИРУСОВ ГЕПАТИТОВ И АНТИТЕЛ К НИМ**

Учебно-методическое пособие

Редактор *Т. Ф. Рулинская*

Компьютерная верстка *Ж. И. Цырыкова*

Подписано в печать 19. 04. 2007

Формат 60×84¹/₁₆. Бумага офсетная 80 г/м². Гарнитура «Таймс»

Усл. печ. л. 6,51. Уч.-изд. л. 7,1. Тираж 100 экз. Заказ № 115

Издатель и полиграфическое исполнение

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

246000, г. Гомель, ул. Ланге, 5

ЛИ № 02330/0133072 от 30. 04. 2004

