

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра –
Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь
И.В. Гаевский
12.12.2012
Регистрационный № 003-0612

**МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА
К ВАКЦИНОУПРАВЛЯЕМЫМ ИНФЕКЦИЯМ**

(полиомиелиту, кори, эпидемическому паротиту, краснухе, коклюшу)

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

д.м.н. Самойлович Е.О., к.б.н. Свирчевская Е.Ю., к.м.н. Ермолович М.А.,
к.б.н. Семейко Г.В., Шиманович В.П., к.м.н. Колодкина В.Л.

Минск, 2012

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

термостат;
микроскоп инвертированный;
вортекс;
камера Горяева;
СО₂-инкубатор;
холодильник;
морозильник;
баня водяная;
центрифуга низкоскоростная с охлаждением;
автоматические пипетки объемом 0,1-10 мкл, 20-200 мкл и 100-1000 мкл.
иммуноферментный анализатор

Материалы:

пластиковые микротитровальные 96-луночные панели с плоским дном и крышками, предназначенные для культур клеток;
стеклянные пробирки (инсулиновые флаконы) объемом 5 мл для титрования вируса;
пробирки центрифужные объемом 10 мл;
флаконы для культур клеток объемом 175 мл;
наконечники с фильтром для автоматических пипеток объемом 0,1-10 мкл, 20-200 мкл и 100-1000мкл;
стеклянные пипетки объемом 1 мл, 5 мл и 10 мл;
микропробирки 1,5 мл, 0,5 мл

Реагенты:

Ростовая среда ДМЕМ – минимальная питательная среда Игла в модификации Дульбеко с добавлением 10 % ЭТС и антибиотиков;

Поддерживающая среда ДМЕМ – минимальная питательная среда Игла в модификации Дульбеко с добавлением 2 % ЭТС и антибиотиков;
эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС);

антибиотики (гентамицин или смесь пенициллина и стрептомицина), конечная концентрация в питательной среде гентамицина – 30-50 мкг/мл, пенициллина – 100 ед/мл, стрептомицина – 100 мкг/мл;

фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ), рН 7,2-7,4;

суспензия культуры клеток с посевной дозой 200 000 клеток/мл;

референс-штаммы вакцинных полиовирусов (штаммы Себина) серотипов 1, 2, 3;

референс-сыворотки с известным уровнем вируснейтрализующих антител к полиовирусам типов 1, 2, 3;

набор иммуноферментный для выявления IgG антител к вирусу кори;

набор иммуноферментный для выявления IgG антител к вирусу краснухи;

набор иммуноферментный для выявления IgG антител к вирусу паротита;

набор иммуноферментный для выявления IgG антител к коклюшному токсину;

лабораторные сыворотки с известным уровнем IgG антител к вирусам кори, краснухи, паротита, коклюшному токсину (для обеспечения внутреннего контроля качества проведения исследования).

Область применения

Настоящая инструкция предназначена для специалистов научно-практических центров, центральных научно-исследовательских лабораторий медицинских университетов, лабораторий центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья областного уровня, клинико-диагностических лабораторий.

Показания к применению

- Мониторинг состояния уровня популяционного иммунитета к вакциноуправляемым инфекциям (полиомиелит, корь, краснуха, паротит, коклюш).
- Оценка эффективности проводимой вакцинопрофилактики.
- Выявление незащищенных групп населения с целью проведения корректирующих мероприятий.
- Оценка иммунного статуса к полиомиелиту, кори, краснухе, паротиту, коклюшу на индивидуальном уровне.

Изучение популяционного иммунитета к вакциноуправляемым инфекциям

Сероэпидемиологический мониторинг напряженности популяционного иммунитета населения к вакциноуправляемым инфекциям является современным и эффективным методологическим подходом долговременной оценки эффективности вакцинопрофилактики, коррекции тактики иммунизации с целью предупреждения распространения инфекционных заболеваний и прогноза возникновения вспышек и эпидемий. В Республике Беларусь такие исследования проводятся с определенной периодичностью. Однако не всегда для этих

исследований используются современные рекомендованные ВОЗ методы и не всегда результаты изучения оцениваются в международных единицах в мл (МЕ/мл), что не дает возможности сравнения полученных данных с данными, полученными в других странах и регионах. В настоящей инструкции излагаются современные методы изучения популяционного иммунитета (к полиомиелиту – реакция нейтрализации в культуре клеток, к кори, краснухе, паротиту и коклюшу – иммуноферментный анализ), а также дается интерпретация результатов проведенных исследований как на индивидуальном, так и на популяционном уровнях.

1. Забор крови для исследования

Сыворотку крови забирают в количестве 0,5-1,0 мл из вены в вакутайнер или из пальца в стерильную центрифужную пробирку с соблюдением всех правил асептики.

2. Получение сыворотки крови

После образования сгустка кровь центрифугируют в течение 5 мин при 1000 об/мин для отделения сыворотки. Сыворотку переносят в стерильную промаркированную пробирку с плотно закрывающейся пробкой. На этикетке указывают фамилию, имя или идентификационный номер пациента, дату забора крови.

Образцы сыворотки крови до проведения исследований могут храниться при температуре 2-8°C до 7 дней. Длительное хранение сывороток возможно при температуре $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Следует избегать многократного размораживания-оттаивания, поскольку оно может привести к разрушению антител и получению ложноотрицательного результата.

Следует также учитывать, что к получению ложноположительных результатов могут приводит гемолиз, гиперлипидемия. Исследовать такие сыворотки нужно с особым вниманием. При возможности следует запросить и исследовать новый образец сыворотки.

Пробы с видимым бактериальным загрязнением не исследуются.

3. Изучение иммунитета к полиомиелиту на основании выявления нейтрализующих антител к полиовирусам 1, 2 и 3 типов в реакции нейтрализации в культуре клеток

Основным рекомендованным ВОЗ методом изучения популяционного иммунитета к полиомиелиту является определение вируснейтрализующих антител в сыворотке крови с использованием реакции нейтрализации в чувствительной культуре клеток. Принцип метода основан на выявлении взаимодействия вирусов с соответствующими антителами в сыворотке крови. Способность этих антител связываться с вирусом и нейтрализовать его проявляется подавлением вирусного цитопатического действия (ЦПД) в культуре клеток.

Для реакции нейтрализации с целью выявления антител к полиовирусу как правило используют клетки Нер-2С (клетки эпидермоидной карциномы человека), хотя могут быть использованы и другие чувствительные к полиовирусу культуры клеток.

В качестве референс-штаммов используют вакцинные штаммы полиовирусов (штаммы Сэбина) типов 1, 2 и 3. Перед постановкой реакции нейтрализации определяют титр референс-штаммов, исходя из которого рассчитывают рабочее разведение для каждого серотипа вируса так, чтобы в 25 мкл вирусосодержащей жидкости содержалось 100 ТЦД₅₀ вируса (ТЦД₅₀ – 50%-ная тканевая цитопатическая доза).

При проведении исследования необходимо предусмотреть следующие контроли:

- контроль референс-сывороток с известным уровнем вируснейтрализующих антител к полиовирусам типов 1, 2, 3;
- контроль рабочего разведения референс-штаммов вакцинных полиовирусов типов 1, 2, 3;
- контроль культуры клеток Нер-2С (посевная доза 2×10^5 клеток/мл);
- контроль токсичности исследуемой сыворотки.

3.1. Проведение исследования

3.1.1. Исследуемые сыворотки инактивируют в течение 30 мин при температуре 56°C.

3.1.2. Готовят разведение 1:4 каждой исследуемой сыворотки, для этого 0,1 мл сыворотки смешивают с 0,3 мл поддерживающей среды. Аналогичным образом готовят разведение референс-сыворотки каждого серотипа полиовируса, для этого 0,05 мл сыворотки смешивают с 0,15 мл поддерживающей среды.

3.1.3. Берут 5 стерильных панелей для культуры клеток, вскрывают и маркируют их (указывают номера исследуемых сывороток, серотип полиовируса, дату проведения исследования). Панели № 1, 2, 3 являются опытными, панели 4, 5 – контрольными (панели № 1, 2 и 3 используются для исследования сывороток в отношении полиовирусов типов 1, 2 и 3, соответственно; панель № 4 – для титрования референс-сывороток, контроля токсичности исследуемой сыворотки, контроля культуры клеток; панель №5 – для титрования рабочей дозы референс-штаммов полиовирусов типа 1, 2 и 3). При использовании пяти панелей в отношении полиовирусов 1, 2 и 3 серотипов могут быть исследованы

6 сывороток крови. Использование 8 панелей позволяет исследовать 12 сывороток крови (6 опытных и 2 контрольные панели). Исследовать в одном опыте более 12 сывороток крови не рекомендуется.

3.1.4. Во все лунки панелей, предназначенных для титрования исследуемых сывороток, за исключением лунок ряда А, вносят по 25 мкл поддерживающей среды.

	№ 1		№ 2		№ 3		№ 4		№ 5		№ 6	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:4	A											
1:8	B											
1:16	C											
1:32	D											
1:64	E											
1:128	F											
1:256	G											
1:512	H											

Рис. 1. Панели № 1, 2, 3 для исследования сывороток к полиовирусам типов 1, 2 и 3, соответственно.

3.1.5. Вносят 50 мкл поддерживающей среды во все лунки контроля культуры клеток (панель № 4, лунки G7-12, H7-12).

3.1.6. Вносят по 25 мкл поддерживающей среды во все лунки рядов А, В, С, D панели для титрования рабочего разведения референс-штаммов полиовирусов типов 1, 2, 3 (панель № 5).

3.1.7. Вносят по 25 мкл ранее разведенной 1:4 исследуемой сыворотки в две пустые лунки ряда А и в две лунки ряда В каждой из

трёх панелей соответствующего типа полиовируса (добавленные ранее 25 мкл среды поддержки в лунки ряда В обеспечивают разведение сыворотки 1:8) (рис. 1).

3.1.8. Проводят серийные двухкратные разведения исследуемых сывороток – смешивают в лунках ряда В сыворотку и поддерживающую среду и переносят 25 мкл смеси в соответствующие лунки ряда С, из ряда С в ряд D и т.д. до ряда H, где разведение сыворотки составит 1:512. Из лунок ряда H 25 мкл жидкости удаляют.

3.1.9. Аналогично делают серийные разведения референс-сывороток к соответствующему типу полиовируса (рис. 2).

контроль токсичности сыв.

		К ПВ1		к ПВ2		к ПВ3		№1	№2	№3	№4	№5	№6
1:4	A												
1:8	B												
1:16	C												
1:32	D												
1:64	E												
1:128	F							контроль культуры клеток					
1:256	G												
1:512	H												

Рис. 2. Панель № 4 для титрования лабораторных референс-сывороток к полиовирусам типов 1, 2, 3, контроля токсичности исследуемых сывороток, контроля культуры клеток.

3.1.10. Готовят рабочее разведение вируса каждого серотипа заданной концентрации в количестве, достаточном для внесения во все

соответствующие лунки (титрования исследуемых сывороток, титрования референс-сывороток, титрования рабочей дозы вируса). Суспензию вируса готовят таким образом, чтобы 100 ТЦД₅₀ содержалось в 25 мкл вирусной суспензии. При проведении исследования 6 сывороток крови (5 панелей) необходимо приготовить 3,0 мл вирусосодержащей суспензии каждого серотипа полиовируса .

3.1.11. Добавляют по 25 мкл рабочего разведения вируса каждого серотипа во все лунки соответствующей панели с раститрованными сыворотками.

3.1.12. Выполняют контрольное титрование полиовирусов типов 1, 2, 3. Титрование начинают с рабочего разведения вируса (100 ТЦД₅₀) и делают три дальнейших 10-кратных разведения в пробирках объемом 10 мл, используя отдельный наконечник для каждого последующего разведения.

3.1.13. В четыре лунки ряда А панели № 5 вносят 25 мкл рабочего разведения вируса. В четыре лунки ряда В вносят 25 мкл последующего разведения вируса (10^{-1} по отношению к рабочей дозе). В четыре лунки рядов С и D вносят разведения вируса 10^{-2} и 10^{-3} , соответственно. Если начать вносить вирусосодержащую суспензию с большего разведения (10^{-3} , лунки ряда D), при переходе от разведения к разведению наконечник можно не менять (рис. 3).

3.1.14. Все заполненные панели закрывают крышкой или плотно заклеивают специальной пленкой и помещают на 3 часа в термостат при температуре 36°C в атмосфере с содержанием 5% CO₂.

3.1.15. Готовят суспензию клеток Нер-2 в среде роста в концентрации 2×10^5 клеток/мл.

		ПВ1				ПВ2				ПВ3			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Рабочая доза	A												
	10^{-1}												
	10^{-2}												
	10^{-3}												
	D												
	E												
	F												
	G												

Рис. 3. Панель №5 для титрования рабочей дозы полиовирусов типов 1, 2, 3.

3.1.16. Добавляют по 100 мкл суспензии клеток во все лунки всех панелей, закрывают крышкой и помещают в термостат при температуре 36°C в атмосфере CO₂. Окончательный учет результатов исследования осуществляют на 5-й день со дня его постановки.

3.2. Учет результатов исследования

3.2.1. Учет результатов проводят визуально по наличию вирусного ЦПД в лунках с использованием инвертированного микроскопа. Результаты исследования считаются достоверными, если показатели контрольных образцов соответствуют установленным значениям (рабочая доза полиовируса, титры антител лабораторных референс-сывороток).

3.2.2. Титрование рабочего разведения референс-штаммов полиовирусов типов 1, 2, 3 подтверждает, что рабочая доза вируса

находится в пределах 50-200 ТЦД₅₀. Если использованная рабочая доза выходит за эти пределы, результаты опыта являются недостоверными. Опыт следует повторить.

3.2.3. Титры антител лабораторных референс-сывороток к 3 серотипам полиовируса не выходят за ранее установленные пределы. Если титры сывороток достоверно отличаются от ожидаемых, опыт необходимо повторить.

3.2.4. Титром антител в сыворотке считается ее наибольшее разведение, защищающее 50% тест-культур (т.е. лунок) от действия 100 ТЦД₅₀ вируса. Титр антител может выражаться величиной, обратной разведению (т.е. при разведении 1:64 титр антител выражается как 64).

3.3. Интерпретация результатов изучения иммунитета к полиомиелиту

3.3.1. Интерпретация результатов на индивидуальном уровне.

Наличие в сыворотке крови антител в титре 1:8 и выше свидетельствует о защищенности индивидуума от соответствующего серотипа полиовируса. Титр антител 1:4 рассматривается как условно-защитный. Если титр антител в исследуемой сыворотке составляет >1:512 (т.е. содержание антител очень высокое и сыворотка оказалась недотитрованной), при необходимости более точного определения титра сыворотку следует протестировать повторно в большем разведении.

3.3.2. Интерпретация результатов на популяционном уровне.

В соответствии с расчетными данными минимальным (критическим) уровнем популяционного иммунитета, необходимым для прекращения циркуляции полиовируса, является 82-87% серопозитивных. Если полученные результаты исследования

свидетельствуют о том, что уровень популяционного иммунитета ниже критического, необходимо предусматривать проведение дополнительных мероприятий по иммунизации.

4. Изучение иммунитета к кори, краснухе и эпидемическому паротиту на основании выявления специфических IgG антител в сыворотке крови с использованием иммуноферментного анализа

Уровень популяционного иммунитета к кори, краснухе, паротиту, принято оценивать по содержанию специфических иммуноглобулинов класса G (IgG) в сыворотке крови. Специфические IgG выявляют методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем, основанных на принципе твердофазного непрямого ИФА. Для определения антител к каждому из перечисленных возбудителей используется соответствующая тест-система.

Принцип метода основан на том, что специфические антитела, содержащиеся в сыворотке крови, связываются с антигеном, сорбированным на носителе. Образовавшийся иммунный комплекс «антиген-антитело» затем связывается с конъюгатом – антителами против иммуноглобулинов G человека, мечеными пероксидазой. Образовавшийся комплекс выявляется в результате ферментативной реакции после внесения раствора субстрата, содержащего хромоген. В результате этой реакции происходит изменение цвета (оптической плотности) реакционной смеси в лунке планшета. Учет результатов проводят на спектрофотометре.

4.1. Проведение исследования

4.1.1. Исследуемые сыворотки и контрольные образцы (позитивный и негативный контроль, входящие в тест-систему, а также

позитивная и негативная человеческие сыворотки с известным титром антител, используемые в качестве внутреннего контроля теста) предварительно разводят разбавляющим буфером в соответствии с инструкцией производителя.

4.1.2. Исследуемые сыворотки и контрольные образцы по 100 мкл вносят в лунки планшета, на дне которых сорбирован соответствующий антиген (вируса кори, краснухи или паротита).

4.1.3. Планшет инкубируют, соблюдая условия, изложенные в инструкции по применению. При инкубации содержащиеся в сыворотке крови специфические антитела связываются с антигеном, образуя иммунные комплексы.

4.1.4. По истечении времени инкубации лунки промывают промывочным буфером с помощью вошера или вручную и просушивают легким постукиванием по фильтровальной бумаге.

4.1.5. После отмывки несвязавшихся антител в лунки добавляют по 100 мкл конъюгата (антитела против иммуноглобулинов G человека, меченые пероксидазой), который взаимодействует с вирус-специфическим комплексом антиген-антитело.

4.1.6. Планшеты инкубируют, соблюдая условия, изложенные в инструкции по применению.

4.1.7. После инкубации планшеты промывают, как описано в п.3.

4.1.8. После отмывки образовавшийся комплекс антиген-антитело-конъюгат выявляют с помощью раствора хромогена, который в присутствии перекиси водорода окрашивает реакционную смесь. Во все лунки планшета вносят по 100 мкл раствора хромогена.

4.1.9. После внесения хромогена планшет инкубируют согласно требованиям инструкции по применению.

4.1.10. Реакцию останавливают внесением во все лунки по 100 мкл останавливающего раствора.

4.2. Учет результатов исследования

4.2.1. Учет результатов исследования проводят на спектрофотометре при длине волны, указанной в инструкции производителя. Интенсивность окраски (оптическая плотность) пропорциональна количеству антител в сыворотке. При отсутствии в исследуемой сыворотке специфических антител иммунные комплексы не образуются, и раствор хромогена не окрашивается.

4.2.2. Значения оптической плотности переводят в концентрацию антител в МЕ/мл в соответствии с рекомендациями, изложенными в прилагаемой инструкции.

4.3. Интерпретация результатов изучения иммунитета к кори, краснухе, эпидемическому паротиту

4.3.1. Интерпретация результатов на индивидуальном уровне.

В отношении вируса кори иммунными считаются лица, у которых концентрация специфических сывороточных IgG антител составляет более 350 мМЕ/мл. Наличие антител в концентрации 150-350 мМЕ/мл свидетельствует об условно защитном уровне иммунитета. Лица с содержанием антител менее 150 мМЕ/мл считаются неиммунными к кори.

В отношении вируса краснухи иммунными считаются лица, у которых концентрация специфических сывороточных IgG антител составляет более 12 МЕ/мл. Лица с содержанием антител в концентрации 10-12 МЕ/мл считаются условно иммунными, а лица с концентрацией антител менее 10 МЕ/мл являются неиммунными.

В отношении вируса паротита иммунными считаются лица, у которых концентрация специфических сывороточных IgG антител составляет более 100 МЕ/мл. Содержание антител в концентрации 70-100 МЕ/мл свидетельствует об условно защитном уровне иммунитета. Лица, имеющие антитела в концентрации менее 70 МЕ/мл, считаются неиммунными.

4.3.2. Интерпретация результатов на популяционном уровне.

Согласно расчетным данным минимальным (критическим) уровнем популяционного иммунитета при кори является 90-95% серопозитивных, при краснухе – 82-87% серопозитивных, при эпидемическом паротите – 85-90% серопозитивных.

Если полученные результаты исследования свидетельствуют о том, что уровень популяционного иммунитета ниже критического, необходимо предусматривать проведение дополнительных мероприятий по иммунизации.

5. Изучение иммунитета к коклюшу на основании выявления IgG антител к коклюшному токсину в сыворотке крови с использованием иммуноферментного анализа

Антитела ко многим антигенам возбудителя в сочетании с клеточным иммунитетом обеспечивают защиту против инфицирования коклюшным микробом. В то же время, проведенные в разных странах мира популяционные исследования эффективности вакцинации показали, что именно выявление IgG антител к коклюшному токсину целесообразно проводить при изучении популяционного иммунитета. ИФА тесты, направленные на выявление антител к филаментозному гемагглютиниру, являющемуся компонентом большинства бесклеточных коклюшных вакцин, имеют высокий уровень ложно

положительных реакций, так как антитела к другим возбудителям (рода *Bordetella*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*) могут перекрестно реагировать с этим антигеном. Определение концентрации IgG к коклюшному токсину может быть использовано не только для изучения популяционного иммунитета к этой инфекции, но и для определения уровня циркуляции возбудителя коклюша. Cut-off (пороговое значение) антител, указывающий на защиту против заболевания, до настоящего времени не определен, однако уровни антител к коклюшному токсину, являющиеся маркером активной или недавно перенесенной инфекции, установлены. Результаты исследования ИФА к коклюшному токсину поддаются стандартизации и могут быть использованы для сравнения данных, полученных разными лабораториями.

Принцип метода аналогичен методу выявления антител к кори, паротиту, краснухе, за исключением того, что в качестве антигена *B. pertussis* на дно лунок в этой тест-системе сорбирован коклюшный токсин.

5.1. Проведение исследования

5.1.1. Все этапы проведения опыта такие же, как изложенные выше для определения антител к кори, краснухе, эпидемическому паротиту.

5.1.2. В соответствии с рекомендациями ВОЗ тест-системы для определения IgG к коклюшному токсину должны содержать стандартную человеческую сыворотку Lot 3 производства Food and Drug Administration (FDA), USA с активностью антител 200 Ед/мл для калибровки теста и пересчета активности антител в FDA-Ед/мл.

При постановке теста должны использоваться позитивная и негативная человеческие сыворотки с известным титром антител в качестве внутреннего контроля теста.

5.2. Интерпретация результатов изучения иммунитета к коклюшу.

Интерпретацию результатов проводят в соответствии с рекомендациями, изложенными в прилагаемой инструкции к тест-системе. При интерпретации результатов следует учитывать данные о возрасте и прививочном статусе обследуемого.

5.2.1. Интерпретация результатов на индивидуальном уровне.

Лица, у которых концентрация IgG к коклюшному токсину в сыворотке крови составляет более 30 FDA-Ед/мл, считаются иммунными. Содержание антител в концентрации 20-30 FDA-Ед/мл считается условно положительным результатом, а лица, имеющие антитела менее 20 FDA-Ед/мл, являются неиммунными. Независимо от возраста титр IgG к коклюшному токсину 100 FDA-Ед/мл и более указывает на активную или недавно перенесенную инфекцию, вызванную *B.pertussis*.

5.2.2. Интерпретация результатов на популяционном уровне.

В соответствии с расчетными данными, минимальным (критическим) уровнем популяционного иммунитета, необходимым для контроля коклюша, является 90-95% серопозитивных.

**6. ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ
ИЗУЧЕНИЯ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА,
ПРИЧИНЫ И ИХ УСТРАНЕНИЕ**

Осложнения	Возможные причины и их устранение
Значения оптической плотности (ОП) контрольных образцов не соответствует области применения, указанной в сертификате контроля качества данной партии	Тест считается недействительным и его надо повторить, учитывая все требования к проведению теста.
Реакционная смесь во всех лунках имеет специфическое окрашивание	При хранении появилось окрашивание субстрата. Такой субстрат использовать нельзя.
Несоответствие интенсивности окрашивания оптической плотности реакционной смеси в лунках	Промывочный буфер мутный. Помутневший раствор использовать нельзя.
При учете реакции нейтрализации титр референс-сывороток не соответствует их стандартному значению.	Неправильно выбрана рабочая доза вируса. Экспериментально подобрать рабочую дозу вируса (50-200 ТЦД ₅₀) и повторить опыт.
Помутнение среды и гибель клеток в лунках.	Бактериальная контаминация.