

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
здравоохранения Республики
Беларусь

Д.Л. Пиневиц

«28» июля 2019 г.

Регистрационный № 076-0519



МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИРАБИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В
СЫВОРОТКЕ КРОВИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

канд. мед. наук, доц. Красько А.Г., канд. мед. наук, Рустамова Л.М.,
Родионова Л.П., Семёнов С.Ф., Климович О.В., Старинская Т.С.

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод оценки поствакцинального иммунного ответа на основе определения титра специфических антител класса IgG в реакции иммуноферментного анализа с последующей интерпретации результатов, который может быть использован в комплексе услуг, направленных на медицинскую профилактику бешенства.

Инструкция предназначена для врачей-инфекционистов, врачей лабораторной диагностики, врачей-эпидемиологов, врачей-вирусологов и иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с подозрением на инфицирование вирусом бешенства в амбулаторных и (или) стационарных условиях, и (или) в условиях отделений дневного пребывания, организациях, осуществляющих государственный санитарный надзор.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Показания к применению

Инструкция может быть использована для оценки гуморального иммунного ответа при плановой вакцинации, а также у лиц, привитых против бешенства при энцефалитах и подозрении на бешенство.

2. Противопоказания

Противопоказания для применения метода отсутствуют.

3. Перечень медицинских изделий, лекарственных средств, реактивов и т.д.

3.1. Медицинская техника:

спектрофлуориметр;

магнитная мешалка;

термостат на 37°C;

промывочное устройство для 96 луночных планшетов;

шейкер-термостат для 96 луночных планшетов;

центрифуга для пробирок типа «Эппендорф», до 13000 об/мин.;
центрифуга лабораторная для пробирок на 7-15-50 мл до 6000 об/мин.;

бокс биологической безопасности класса BSLII;

комплект автоматических дозаторов;

вортекс-шейкер;

твердотельный термостат;

холодильник медицинский;

морозильник с температурой (-20°C).

3.2. Медицинские изделия:

планшет для иммунологических исследований 96-луночный, с плоским дном;

пробирки пластиковые типа «Эппендорф» (1,5 мл, 2 мл, 15 мл, 50 мл);

наконечники полимерные с фильтрами для автоматических дозаторов 1-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл;

штативы для пробирок.

3.3. Материалы для сбора клинических образцов:

пробирки пластиковые типа «Эппендорф» (1,5 мл, 2 мл);

вакутайнеры с активатором свёртывания для забора крови;

транспортировочные контейнеры для упаковки и транспортировки проб в соответствии с условиями работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) 2 группы биологического риска.

3.4. Реагенты для проведения исследований:

инактивированный антиген вируса бешенства;

конъюгат антител против человеческие IgG человека с пероксидазой;

фосфатно-солевой буфер для разведения образцов сыворотки крови;

фосфатно-солевой буферный раствор с Tween 20 для промывки лунок;

раствор тетраметилбензидина;
стоп-реагент (раствор 1Н серной кислоты);
контрольная сыворотка с известным содержанием антител класса IgG к вирусу бешенства.

4. Технология использования метода оценки поствакцинального иммунного ответа у лиц, привитых против бешенства.

Материалом для исследования является сыворотка крови привитого человека.

4.1. Правила получения, транспортировки и хранения биологического материала

Получение биологического материала следует производить с соблюдением правил работы с ПБА 2 группы риска в соответствии с СанНиП «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утверждёнными постановлением Министерства Здравоохранения Республики Беларусь 6 января 2017 г., № 2.

Получение крови для проведения серологического исследования осуществляется не ранее чем через 21 день после окончания процедуры вакцинации. Взятие крови следует производить натощак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в вакутайнер. После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с коагулянтом. После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив и доставить в лабораторию. Транспортирование биологического материала осуществляется в специальном термоконтейнере с охлаждающим элементом или в термосе со льдом. В случае невозможности быстрой транспортировки, материал должен храниться при температуре от 20°C до

25°C – в течение 6 часов после получения цельной крови; при температуре от 2°C до 8°C – не более одних суток. Не допускается замораживание-оттаивание образцов цельной крови до проведения исследований.

Каждый образец для исключения взаимной контаминации хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

4.2. Иммуноферментный анализ с целью определения титра антител к вирусу бешенства в биологическом материале

4.2.1. Предварительная подготовка проб биологического материала.

Все работы проводят в условиях стерильного бокса, используя стерильные инструменты, посуду и растворы. Сыворотку крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10-20 минут при 3000 об/мин., после чего сыворотку отбирают наконечниками (на 1 мл) с аэрозольным барьером и переносят в пробирки типа «эппендорф», стараясь не контаминировать её сгустком. Образцы сыворотки крови желательно разлить небольшими (0,1-0,2 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Образцы, предназначенные для длительного хранения, отбирают в пробирки на 2 мл с завинчивающимися крышками. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия хранения:

образцы сыворотки крови: при температуре от 2°C до 8°C – не более 4-6 дней, при (-20°C) до 6 месяцев, при (-70°C) - до года и более.

4.2.2. Проведение иммуноферментного анализа для определения антител к вирусу бешенства.

Иммуноферментный анализ проводят постановкой непрямого метода с использованием препарата инактивированного антигена (цельновирioнный инактивированный β -пропиолактоном аттенуированный штамм вируса), сыворотки крови вакцинированных антирабической вакциной пациентов и

коммерческих меченых пероксидазой хрена козьих антител к IgG человека, однокомпонентного субстрата (ТМБ) по схеме на рисунке 1



Рисунок 1 - Схема постановки иммуноферментного анализа для выявления иммуноглобулинов класса IgG/IgM в сыворотках крови вакцинированных против вируса бешенства пациентов

Процедура постановки непрямого ИФА:

- внести в лунки полистирольного планшета по 100 мкл буфера PBS/BSA (8 г NaCl, 0,2 г KCl, 0,2 г Na₂HPO₄·12H₂O, 2,9 г KH₂PO₄, 1 г бычьего сывороточного альбумина - БСА, дистиллированная вода до 1 л) и 5 мкл препарата антигена бешенства, инкубировать ночь при температуре 4 °С,

- на следующий день трижды промыть планшет с применением PBS, содержащего 0,05% Твин-20 (PBS-Т) (8 г NaCl, 0,2 г KCl, 0,2 г Na₂HPO₄·12H₂O, 2,9 г KH₂PO₄, 500 мкл Твин-20, дистиллированная вода до 1 л). После промывания добавить в каждую из тестовых лунок по 200 мкл блокирующего буфера (PBS, содержащий 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) или обезжиренного сухого молока) и инкубировать при 37 °С, один час,

- трижды промыть планшет с помощью PBS-Т,

- приготовить рабочее разведение сывороток пациентов на PBS и внести в лунки по 100 мкл, инкубировать при 37 °С в течение 1,5 часа, а затем трижды промыть планшет с помощью PBS-Т.

- внести в каждую в лунку по 100 мкл конъюгата козьих антител против IgG/IgM человека, меченых пероксидазой хрена в PBS, содержащем 0,2% БСА. Инкубировать при 37 °С в течение 1 часа, а затем четыре раза промыть планшет с помощью PBS-T.

- внести в каждую тестовую лунку по 100 мкл раствора однокомпонентного субстрата (ТМБ). Выдержать в темноте при комнатной температуре в течение 15 – 30 мин, остановить реакцию 0,2N раствором H₂SO₄ и просчитать уровень поглощения на 450 нм.

4.2.3. Учет результатов

Для определения титра антител используется стандартная процедура сравнения результатов спектрометрического анализа проб и контрольных образцов – отрицательного контрольного образца (лунка с PBS/BSA), контроля контаминации конъюгата (лунка с ТМБ на PBS/BSA) и положительного образца – заведомо положительная сыворотка привитого с показателем OD₄₅₀ не менее– 1,5 в разведении сыворотки 1:50.

4.2.4. Интерпретация результатов исследований

Алгоритм оценки поствакцинального иммунного ответа у контингента лиц, привитых против бешенства представлен на рисунке 2. Прежде всего необходимо дифференцировать исследуемый материал (сыворотка крови) полученные у пациентов с ПОСТэкспозиционной и ПРЕДэкспозиционной вакцинацией в связи с различием целей, схем введения и доз. В случае постэкспозиционной вакцинации необходимо учитывать полноту схемы, опасность локализации и повреждений у пациента. При появлении неврологической симптоматики у пациента важно проводить выявление вирус нейтрализующих антител класса IgG не только в сыворотке, но и в спинномозговой жидкости пациента.

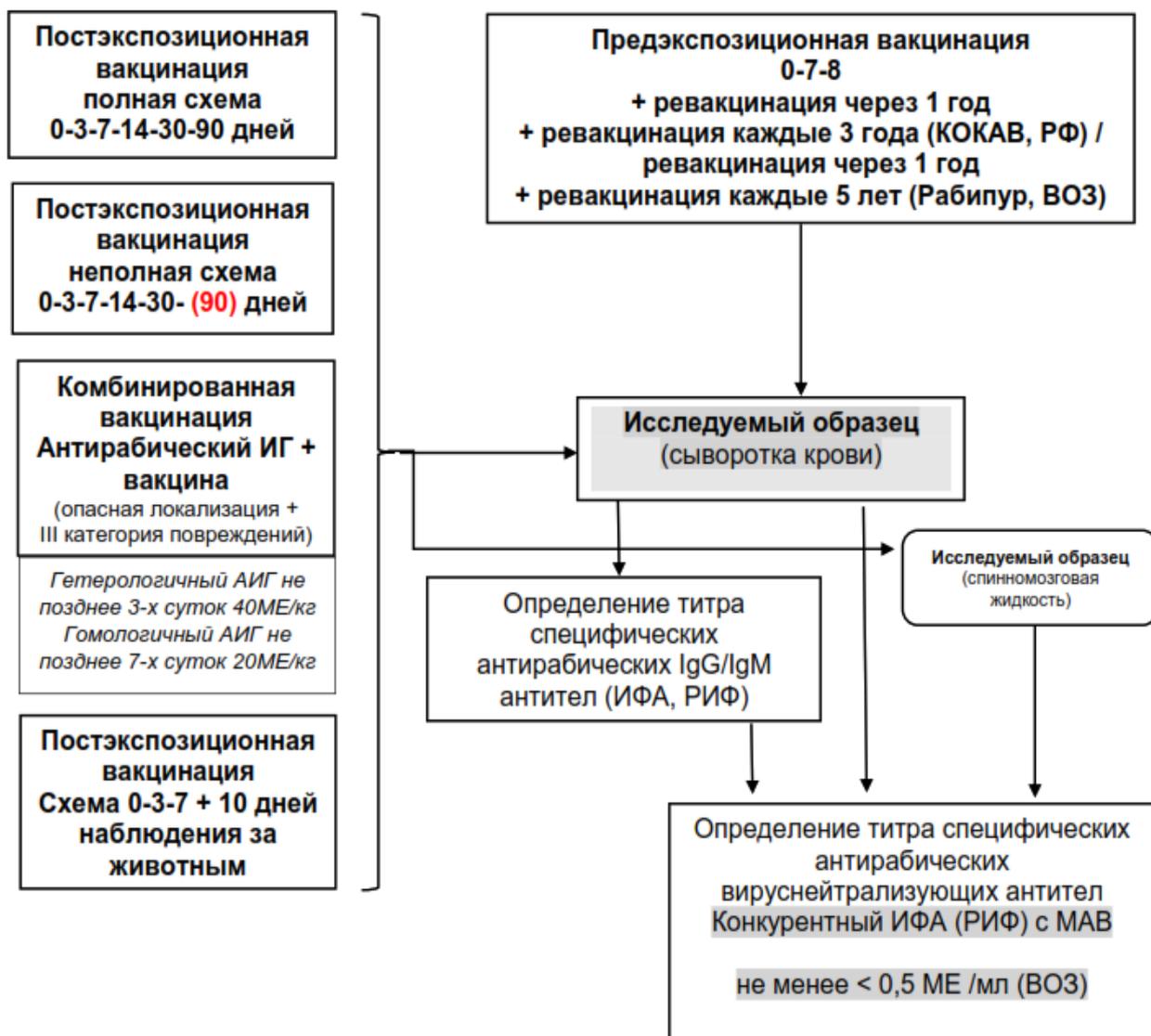


Рисунок 2 - Алгоритм оценки поствакцинального иммунного ответа у контингента лиц, привитых против бешенства.

5. Перечень возможных ошибок, ограничений и пути их устранения

В таблице 1 представлены проблемы и методические ошибки, которые могут возникать при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения.

Таблица 1 Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Низкие значения спектрофлуорометрического анализа.	Деградация в процессе забора-транспортировки крови и/или низкое содержание IgG	Использовать только свежие образцы биологического материала для получения сыворотки крови пациентов.
	Деградация IgG	Использовать пробы сразу после выделения сыворотки.
Отсутствие сигнала при проведении ИФА, контрольные образцы соответствуют заданным параметрам	Погрешности в проведении реакции ИФА	Контроль качества реагентов путём использования в реакции контрольных образцов.
Отсутствие сигнала при проведении ИФА, контрольные образцы не соответствуют заданным параметрам	Ошибки в проведении реакции, не добавлен один или несколько компонентов	Повторить процедуру определения антител методом ИФА
	Контаминация реагентов общего пользования/планшета и пр.	Повторить процедуру определения антител методом ИФА.