

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
здравоохранения

Республики Беларусь

Е.Н.Кроткова

2023 г.

Регистрационный № 120-1223

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ
ГЕПАТИТОВ В, С, ВИЧ И СИФИЛИСА
В ПЛАЗМЕ (СЫВОРОТКЕ) КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии»

АВТОРЫ: докт. мед. наук Владыко А.С., канд. биол. наук
Семижон П.А., канд. биол. наук Счесленок Е.П., Сухоцкая Е.А.

Минск, 2023

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
здравоохранения

Республики Беларусь

_____ Е.Н. Кроткова

18.12.2023

Регистрационный № 120-1223

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ
ГЕПАТИТОВ В, С, ВИЧ И СИФИЛИСА
В ПЛАЗМЕ (СЫВОРОТКЕ) КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии»

АВТОРЫ: докт. мед. наук Владыко А.С., канд. биол. наук
Семижон П.А., канд. биол. наук Счесленок Е.П., Сухоцкая Е.А.

Минск, 2023

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод выявления антител к возбудителям сифилиса, вирусам гепатитов В и С, иммунодефицита человека в сыворотке (плазме) крови человека с использованием иммуноферментного анализа, основанного на применении в качестве антигенного компонента рекомбинантных полипептидов.

Инструкция предназначена для клинико-диагностических лабораторий учреждений здравоохранения, осуществляющих диагностику вирусных гепатитов В, С, ВИЧ и сифилиса в качестве экспресс-метода.

Показания к применению

Медицина катастроф: стихийные бедствия, аварии и иные непрогнозируемые ситуации, сопряженные с наличием большого количества пациентов с травмами, требующими хирургического вмешательства.

Противопоказания к применению

Противопоказания к применению метода, изложенного в настоящей инструкции, отсутствуют

Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов, лекарственных средств и т.д.:

Для пробоподготовки сыворотки (плазмы) крови

1. Микроцентрифуга высокоскоростная (с ротором для 1,5 мл пробирок типа «Эппендорф», 10000-14000 об/мин).
2. Дозаторы пипеточные механические переменного объёма, комплект (2 - 20 мкл; 20 - 200 мкл; 100 - 1000 мкл).
3. Пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл.
4. Холодильник (диапазон рабочих температур от +2 до +4°C).

5. Халаты, маски, резиновые перчатки, штативы для пробирок.

Для проведения иммуноферментного анализа

1. Иммуноферментный анализатор с длиной волны учета реакции 450 нм и референс-волной 620 нм (любой марки и производителя).

2. 96-луночная панель с сенсibilизированными в лунках пептидами на *Trponema pallidum*, гепатиты В, С и ВИЧ (по 3 стрипа на один рекомбинантный полипептид) – предоставляется РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, описание представлено в приложении.

3. Положительные контрольные образцы сыворотки крови, содержащие специфические антитела к возбудителям гепатитов В, С, ВИЧ и сифилиса (предоставляются РНПЦ эпидемиологии и микробиологии).

4. Отрицательный контрольный образец сыворотки крови, не содержащий специфических антител к возбудителям гепатитов В, С, ВИЧ и сифилиса (предоставляется РНПЦ эпидемиологии и микробиологии).

5. Антивидовой конъюгат (концентрат) на постановку 12 образцов сывороток (плазмы) крови – 0,06 мл (1,0 мг/мл, мышинные моноклональные антитела к IgM человека (Fc-фрагменту) меченые пероксидазой хрена, Abscam, № ab106742 либо аналогичные).

6. Отмывочный буфер (25-кратный концентрат) – 10 мл (0,01М ФСБ, рН 7,4 AppliChem A9162, 0100 либо аналогичный, содержащий 0,05% Твин-20).

7. Буфер для разведения сывороток (БРС) – 12 мл (0,01М ФСБ, рН 7,4 AppliChem A9162, либо аналогичный, содержащий 0,05% Твин-20).

8. Буфер для разведения конъюгата (БРК) – 12 мл (0,01М ФСБ, рН

7,4 AppliChem A9162, либо аналогичный, содержащий 0,05% Твин-20).

9. Субстратный буферный раствор (СБ) (цитратный буферный раствор, рН 4,0).

10. Тетраметилбензидин (ТМБ), 3,6 мг/мл, Chem-Impex Int'1 00287 либо аналогичный - 0,6 мл.

11. Стоп-раствор (1М H₂SO₄) – 12 мл.

12. Клейкая лента для иммунологической панели (Nerbe plus или аналог) - 2 шт.

13. Пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл.

14. Дозаторы пипеточные механические переменного объёма, комплект (2 - 20 мкл; 20 - 200 мкл; 100 - 1000 мкл).

15. Дозатор 8-ми канальный механический переменного объёма (20-200 мкл).

16. Кювета для 8-канального дозатора – 2 шт.

17. Халаты, маски, резиновые перчатки, штативы для пробирок.

18. Фильтровальная бумага.

19. Термостат, позволяющий поддерживать температуру +37 °С.

Описание метода с указанием этапов

Этап 1 Получение и хранение образцов сыворотки (плазмы)

крови.

Сбор, хранение образцов сыворотки (плазмы) крови производится в соответствии с режимом работы лабораторий инфекционного стационара учреждений Министерства здравоохранения Республики Беларусь (Приказ МЗ РБ 29.06.2007 №551 «О проведении аккредитации клинико-диагностических лабораторий учреждений здравоохранения Республики Беларусь», постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19.05.2011 № 36 «Об установлении перечня

инфекционных заболеваний, на наличие которых исследуются кровь и ее компоненты», постановление МЗ РБ 29.01.2018 №13 «Об утверждении типовой инструкции по охране труда при выполнении работ в клинико-диагностических лабораториях организаций здравоохранения»).

Материалом для исследования с целью выявления антител к возбудителям сифилиса, вирусов гепатитов В и С, иммунодефицита человека является сыворотка (плазма) крови в пробирках объемом 5-10 мл непосредственно после получения, либо через сутки (но не более 5 суток) после взятия крови у пациента (хранение в холодильнике при температуре +(4-6) °С).

Этап 2 Проведение иммуноферментного анализа

Одна 96-луночная панель с сенсibiliзироваHHыми в лунках пептидами (по 3 стрипа на один рекомбинантHый полипептид) с расположением специфических пептидов в последовательности: *Trponema pallidum* (3 стрипа), гепатит В (3 стрипа), гепатит С (3 стрипа), ВИЧ (3 стрипа), предназначена для дифференцированного выявления антител к возбудителям гепатитов В, С ВИЧ и сифилиса и исследования одновременно до 12 образцов.

Подготовка образцов для исследования

Сыворотка (плазма) крови перед внесением в лунки 96-луночной панели центрифугируется на микроцентрифуге в течение 10-15 минут при 12000 об/мин. Полученная надосадочная жидкость (супернатант) используется в иммуноферментном анализе.

Проведение иммуноферментного анализа

Исследования проводятся в дублях для каждого образца. Один исследуемый образец сыворотки (плазмы) крови анализируется на

четырёх группах стрипов панели (см. Приложение), одновременно вносятся положительный и отрицательный контрольные образцы. Исследуемые и контрольные образцы вносятся в разведении 1/100 в буферном растворе для разведения сывороток (БРС) в объеме 100 мкл/лунку (предварительно осуществляют разведение исходного образца: на 10 мкл сыворотки (плазмы) вносят на 1 мл БРС, тщательно перемешивают пипетированием) и инкубируют в течение 1 часа при температуре +37 °С. После инкубации панель (стрипы) промываются 3 раза отмывочным буферным раствором, приготовленным из концентрата (из расчета – на 1 мл концентрата 24 мл дистиллированной воды). После промывок вносится антивидовой пероксидазный конъюгат в рабочем разведении (5 мкл конъюгата на 1 мл БРС) в объеме 100 мкл/лунку, инкубируется в течение 1 часа при температуре +37 °С. После 3-кратной отмывки вносится ТМБ субстрат (готовится из расчета 50 мкл ТМБ на 1 мл СБ) и инкубируется в течение 15-20 минут при температуре +(21-23) °С. Реакцию останавливают внесением в лунки 100 мкл стоп-раствора, результаты регистрируют на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Этап 3 Анализ и учет результатов

Оценку результатов осуществляют относительно рассчитываемого значения критической оптической плотности отдельно для каждой инфекции:

$$\text{ОП(кр.)} = \text{ОП}_{\text{к-}}(\text{ср}) + 0,2 \quad (1)$$

где $\text{ОП}_{\text{к-}}(\text{ср})$ – среднее значение оптической плотности отрицательного контрольного образца.

Интерпретацию результатов исследования производят с учетом коэффициента позитивности (КП), рассчитываемого по формуле:

$$КП=ОП(иссл.сыв)/ОП(кр.) \quad (2)$$

При этом, результат расценивается как отрицательный при $КП < 1$ и положительный, если $КП \geq 1$.

Перечень возможных ошибок, ограничений и пути их устранения

Проведение иммуноферментного анализа подразумевает соблюдение правил на всех этапах работы: хранение, пробоподготовка, сам анализ.

Несоблюдение данных правил приводит к возникновению ошибок, которые становятся причиной ложноположительных или ложноотрицательных результатов, что в свою очередь, приводит к неверной интерпретации результатов.

Причины ложноположительных результатов: перекрестная контаминация от образца к образцу в процессе пробоподготовки и на стадии проведения иммуноферментного анализа.

Причины появления ложноотрицательных результатов: деградация иммуноглобулинов в пробах вследствие случайного попадания ионных детергентов.

Пути устранения – строгое соблюдения правил на стадии пробоподготовки и проведения анализа. На всех этапах исследования необходимо использование одноразовой пластиковой посуды и наконечников.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Схема иммунологической панели и расположения на ней
антигенов для выявления антител к возбудителям вирусных гепатитов
В, С, ВИЧ и сифилиса

Номер лунки												
Обозначения рядов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

 - в лунках сорбирован рекомбинантный антиген возбудителя сифилиса (*Treponema pallidum*);

 - в лунках сорбирован рекомбинантный антиген вируса гепатита В;

 - в лунках сорбирован рекомбинантный антиген вируса гепатита С;

 - в лунках сорбирован рекомбинантный антиген вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).