

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
здравоохранения Республики
Беларусь

 Д.Л. Пиневиц

«28» 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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
28.06.2019

Регистрационный № 076-0519

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИРАБИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ**

инструкция по применению

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

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

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 интерпретацией 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.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Медицинская техника:

спектрофлуориметр;

магнитная мешалка;

термостат на 37 °С;

промывочное устройство для 96-луночных планшетов;

шейкер-термостат для 96-луночных планшетов;

центрифуга для пробирок типа эппендорф до 13 000 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 °С.

Медицинские изделия:

планшет для иммунологических исследований 96-луночный с плоским дном;

пробирки пластиковые типа эппендорф (1,5; 2; 15 и 50 мл);

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

штативы для пробирок.

Материалы для сбора клинических образцов:

пробирки пластиковые типа эппендорф (1,5 и 2 мл);

вакутайнеры с активатором свертывания для забора крови;

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

Реагенты для исследований:

инактивированный антиген вируса бешенства;

конъюгат антител против человеческих IgG 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.

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.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

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

Материалом для исследования является сыворотка крови привитого человека.

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», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 № 2.

Получение крови для серологического исследования осуществляется не ранее чем через 21 день после окончания процедуры вакцинации. Забор крови следует производить натошак или через 3 ч 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. Биологический материал транспортируется в специальном термоконтейнере с охлаждающим элементом или в термосе со льдом. В случае невозможности быстрой транспортировки материал должен храниться при температуре от 20 до 25 °С в течение 6 ч после получения цельной крови; при температуре от 2 до 8 °С — не более 1 сут. Не допускается замораживание-оттаивание образцов цельной крови до выполнения исследований.

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

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

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 мин при 3000 об/мин после чего сыворотку отбирают наконечниками (на 1 мл) с аэрозольным барьером и переносят в пробирки типа эппендорф стараясь не контаминировать ее сгустком. Образцы сыворотки крови желателно 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 до 8 °С – не более 4-6 дней; при температуре -20 °С — до 6 мес., при температуре -70 °С — до 1 года и более.

2. Иммуноферментный анализ для определения антител к вирусу бешенства.

Иммуноферментный анализ осуществляют постановкой непрямого метода с использованием препарата инактивированного антигена (цельновиреонный инактивированный β-пропиолактоном аттенуированный штамм вируса), сыворотки крови вакцинированных антирабической вакциной пациентов и коммерческих меченных пероксидазой хрена козых антител к IgG человека, однокомпонентного субстрата (ТМБ) по схеме на рисунке 1



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

Процедура выполнения 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 (BSA), 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-T) (8 г NaCl, 0,2 г KCl, 0,2 г Na₂HPO₄·12H₂O,

2,9 г KH_2PO_4 , 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 % БСА или обезжиренного сухого молока) и инкубировать при 37 °С, 1 ч,

трижды промыть планшет с помощью PBS-T;

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

внести в каждую в лунку по 100 мкл конъюгата козьих антител против IgG/IgM человека, меченных пероксидазой хрена в PBS, содержащем 0,2 % БСА. Инкубировать при 37 °С в течение 1 ч, а затем 4 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 H_2SO_4 и рассчитать уровень поглощения на 450 нм.

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 OD_{450} не менее — 1,5 в разведении сыворотки 1:50.

4. Интерпретация результатов

Алгоритм оценки поствакцинального иммунного ответа у контингента лиц, привитых против бешенства, представлен на рисунке 2. Прежде всего необходимо дифференцировать исследуемый материал (сыворотка крови), полученный у пациентов с пост- 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 важно выявлять вирус нейтрализующих антител класса IgG не только в сыворотке, но и спинно-мозговой жидкости пациента.

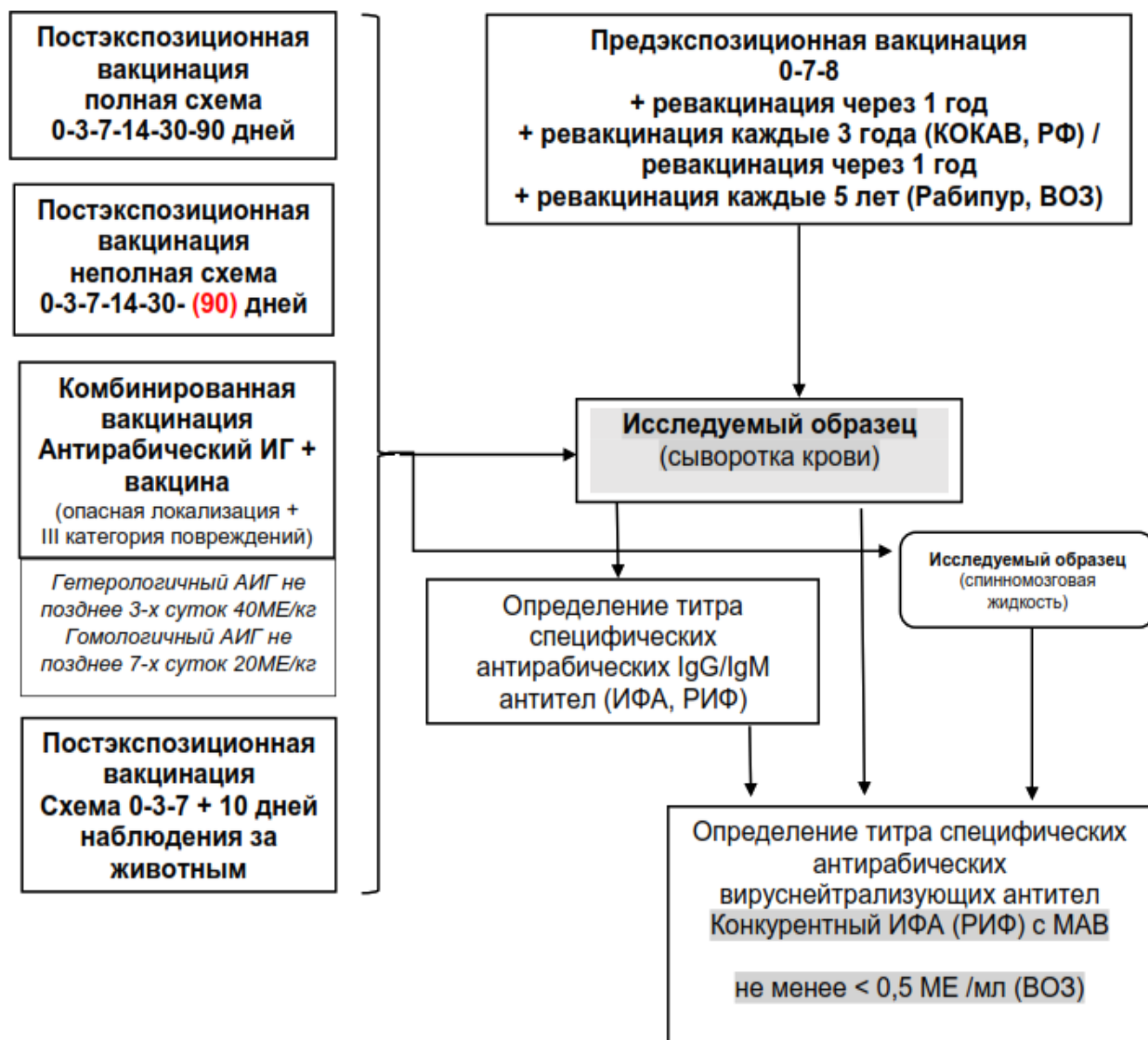


Рисунок 2. — Алгоритм оценки поствакцинального иммунного ответа контингента лиц, привитых против бешенства

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

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

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

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Низкие значения спектрофлюорометрического анализа Отсутствие сигнала при выполнении ИФА, контрольные образцы соответствуют заданным параметрам	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 крови
	Погрешности в выполнении реакции ИФА	Контроль качества реагентов путем использования в реакции контрольных образцов
Отсутствие сигнала при выполнении ИФА, контрольные образцы не соответствуют заданным параметрам	Ошибки в постановке 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