

Национальная академия наук Украины  
Технологический парк ИМК  
Научно-производственная компания «Диапроф-  
Мед»

**ПРАКТИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ  
по ИММУНОФЕРМЕНТНОМУ АНАЛИЗУ**

(для врачей-лаборантов медицинских и  
ветеринарных учреждений по работе с тест-системами  
производства «Диапроф-Мед»)

Киев-2003

**УДК 616.98-07:578.826.6**

**«Практическое пособие по иммуноферментному анализу»**

Авторы: Иванская Н.В., Кислых Е.Н., Максименок Е.В., Раевская Г.Е., Пилипенко В.Г.

Под редакцией проф. А.Л.Гураля и проф. Н.Я.Спивака.

Для диагностики различных инфекционных заболеваний, для выявления специфических антигенов и антител в биологических жидкостях (плазме и сыворотке крови, моче, слюне, молоке и т.д.) широко применяют метод иммуноферментного анализа, который стал надежным помощником врачей-лаборантов медицинских и ветеринарных учреждений. Научно-производственная компания «Диапроф-Мед», используя новейшие достижения генной инженерии, молекулярной биологии, гибридной технологии и иммунобиотехнологии, разработала полный цикл производства иммуноферментных тест-систем для диагностики инфекционных заболеваний человека и сельскохозяйственных животных и ныне выпускает такие тест-системы.

Для врачей, ветеринаров, вирусологов, иммунологов, микробиологов, сотрудников лабораторий, студентов высших учебных заведений и аспирантов.

Рецензенты: Академик УААН, д.б.н., проф. Бойко А.Л., д.б.н. проф. Полищук В.П., д.б.н., ст.н.с. Рыбалко С.Л.

Рекомендовано в печать на заседании  
Ученого Совета Института микробиологии и  
вирусологии им.Д.К.Заболотного НАНУ  
Протокол № 7 от 3.06.2003

### Сокращения, использованные в тексте пособия:

- АБТС – 2,2'азинобис-3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота;
- АГ – антиген;
- АТ – антитело;
- ГЗ – граничное значение (показателя оптической плотности);
- ИФА – иммуноферментный анализ;
- К<sup>-</sup> – отрицательная контрольная проба;
- К<sup>+</sup> – положительная контрольная проба;
- НПЗ – негативное прогнозируемое значение;
- ОП – оптическая плотность;
- ОГ ср К<sup>-</sup> – среднее значение оптической плотности для проб отрицательного контроля;
- ОГ ср К<sup>+</sup> – среднее значение оптической плотности для проб положительного контроля;
- ОФД – ортофенилендиамин (*o*-фенилендиамин);
- ППЗ – позитивное прогнозируемое значение;
- РИА – радиоиммунный анализ;
- ТИФА – твердофазный иммуноферментный анализ;
- ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;
- CDC (U.S.A. Centers for Disease Control and Prevention) – Центры США по контролю и предупреждению заболеваний;
- CV (coefficient of variation) – коэффициент вариации;
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазный иммуноферментный анализ, ТИФА;
- HBcAg (core antigen of the hepatitis B virus) – сердцевинный (кóровый) антиген вируса гепатита В;
- HBsAg (surface antigen of the hepatitis B virus) – поверхностный антиген вируса гепатита В;
- IR (initial reactive serum) – начально-реактивная сыворотка;

RR (repeat reactive serum) – повторно-реактивная сыворотка;

USA FDA (USA Food and Drug Administration)  
Администрация США по вопросам продовольствия и медикаментов.

## Вступление

В последнее время для диагностики различных заболеваний все шире используют иммуноферментные тест-системы. Во многих клинических лабораториях, санитарно-эпидемиологических станциях, станциях переливания крови, ветеринарных учреждениях успешно используют иммуноферментный анализ (ИФА). Он становится повседневным методом обнаружения специфических антигенов и антител в биологических жидкостях (плазме и сыворотке крови, моче, слюне, спинномозговой жидкости, молоке и т.д.).

Научно-производственное объединение «Диапроф-Мед» – это предприятие, использующее новейшие достижения биотехнологии для производства иммуноферментных тест-систем медицинского и ветеринарного назначения.

В практике научно-производственной деятельности предприятия широко используются современные методы иммунологии, генной инженерии, биотехнологии.

Сегодня уровень развития научной и производственной базы компании «Диапроф-Мед» дает возможность полностью осуществлять весь замкнутый цикл производства – от получения рекомбинантных белков, используемых в качестве антигенов, до поставок готовых иммуноферментных тест-систем потребителю.

На предприятии разработаны и производятся около двух десятков тест-систем медицинского назначения для диагностики ВИЧ-инфекций, гепатитов В и С, сифилиса, хламидиоза, комплекса TORCH-инфекций (ЦМВ, краснухи и простого герпеса первого и второго типа) и четыре тест-системы ветеринарного назначения для диагностики туберкулеза, лептоспироза и бруцеллеза крупного рогатого скота (см. Приложение).

Предприятие «Диапроф-Мед» – это коллектив высококвалифицированных специалистов, цель которых – становление и развитие отечественной биотехнологии для потребностей здравоохранения и сельского хозяйства. На предприятии организована система подготовки работников диагностических лабораторий Украины в области иммуноферментной диагностики. С 1997 г. проведено 23 научно-практических семинара как на базе НПК «Диапроф-Мед», так и в ряде областей страны. В работе семинаров приняли участие более 500 врачей-лаборантов.

Поэтому, принимая во внимание опыт обучения сотрудников диагностических лабораторий, предприятие планирует выпуск ряда методических пособий и рекомендаций для врачей-лаборантов по работе с иммуноферментными тест-системами. Данное практическое пособие по иммуноферментному анализу будет первым в ряду таких публикаций. Мы стремились систематизировать и расширять знания практических врачей-лаборантов в области иммуноферментного анализа, помочь им избежать ошибок при проведении исследований, оценить достоверность результатов, полученных после постановки иммуноферментной реакции.

## **Иммуноферментный анализ**

Иммуноферментный анализ (ИФА) возник на стыке двух дисциплин – иммунохимии и инженерной энзимологии – и стал одним из самых распространенных методов исследования.

Благодаря успехам биотехнологии и генной инженерии удастся получить высокоочищенные белки-антигены, разнообразные поли- и моноклональные антитела заданной специфичности и аффинности, ферменты-маркеры и конъюгаты ферментов с антигенами и антителами.

Весь процесс проведения ИФА можно подразделить на три основных стадии: иммунохимический процесс – формирование комплекса антиген-антитело (АГ-АТ), присоединение к нему метки и ее визуализацию.

Сегодня наиболее распространен твердофазный ИФА (ELISA, т.е. enzyme-linked immunosorbent assay, ТИФА), предложенный впервые в 1971 г. [1]. В основе его лежат принципы, использованные ранее в радиоиммунном анализе (РИА), где применяют радиоактивную метку. В ИФА вместо радиоактивной используют ферментную метку. Ферменты, применяемые в ИФА, характеризуются длительным периодом полуинактивации (при 4 °С они сохраняются более полугода); они не создают радиационной опасности, дают возможность получать количественные и визуальные качественные тесты для массового анализа образцов.

Сегодня ИФА все шире используется благодаря ряду его преимуществ. К ним относятся: высокая чувствительность, специфичность и воспроизводимость получаемых результатов, достаточность для анализа минимальных объемов исследуемых образцов биологических жидкостей, доступность и стабильность

реагентов, простоту и быстроту проведения анализа, инструментальный учет результатов реакции и автоматизацию почти всех этапов ИФА, возможность проведения массовых анализов и, не в последнюю очередь, относительно невысокая стоимость диагностических наборов.

Следует отметить, что хотя существует несколько вариантов ИФА (прямой, непрямой, конкурентный, «сэндвич»), во всех случаях ИФА используют конъюгат фермента со специфическими или противовидовыми антителами или антигенами и проявитель (смесь субстрата с хромогеном); в результате взаимодействия фермента с субстратом реакционная смесь окрашивается под действием хромогена. Это позволяет визуально или автоматически оценивать наличие антител или антигенов в исследуемом материале.

## Терминология

Антиген (правильнее «иммуноген») – вещество, которое вызывает возникновение специфического иммунного ответа и специфически реагирует с антителами, возникающими при введении антигена в организм.

Антитело – сложное природное соединение (гликозилированный полипептид), возникающее в результате иммунного ответа организма при введении в организм или попадании в него чужеродных веществ, а также возбудителей инфекционных болезней, разнообразных паразитов и т.д.

Конъюгат – искусственная молекула, которая состоит не менее чем из двух химически объединенных компонентов, часто различного происхождения; для проведения ИФА используют обычно конъюгаты,



которые содержат ферментную (или иную) метку, пришитую к антигену (антигенам), антителам или белку A *Staphylococcus aureus*.

Проявитель – смесь ферментного субстрата с хромогеном, которая служит для обнаружения (проявления) иммуноферментной реакции; после взаимодействия фермента с субстратом реакционная смесь, содержащая продукт реакции, окрашивается под действием хромогена.

Субстрат – вещество, на которое специфически направлено действие фермента. В результате взаимодействия фермента с субстратом возникает продукт реакции.

Хромоген (в контексте нашего изложения) – это вещество, обычно бесцветное (лейкоформа), но способное давать окрашенное соединение (хромоформу) в результате взаимодействия с продуктом, возникающим при ферментативной реакции.

### **Иммуноферментный анализ для обнаружения антител**

Обнаружение специфических антител в физиологических жидкостях играет важную роль в клинической диагностике широкого круга заболеваний как инфекционного, так и аутоиммунного характера. Благодаря ИФА появилась возможность количественно определять антитела в широком диапазоне концентраций, используя одно-единственное разведение сыворотки или плазмы. ИФА позволяет также легко отличать антитела, принадлежащие к разным классам иммуноглобулинов. Объективность количественных и качественных оценок достигается благодаря инструментальной фотометрии; при этом интенсивность регистрируемых сигналов

непосредственно коррелирует с уровнем определяемых антител. При правильном подборе соответствующего специфического антигена, который связывается с носителем, и оптимального конъюгата с ферментной меткой можно создать системы тестирования очень многих разнообразных антител.

Сегодня для определения антител чаще всего используют непрямой вариант ТИФА и сэндвич-метод. При непрямом ТИФА на твердую фазу сорбируют АГ, а потом вносят в лунки исследуемый материал, содержащий искомые АТ. После инкубации и отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляют противовидовые антитела, меченные ферментом (АТ\*). В результате реакции образуется тройной комплекс АГ1-АТ1-АТ2\*, который потом визуализируется при помощи ферментативной реакции после добавления проявителя.

Сэндвич-метод (иногда его называют также тройным антигенным сэндвичем) основан на применении одинаковых антигенов (или разных иммунодоминантных антигенов того же возбудителя) – немеченных (в составе сорбента) и меченных ферментом (в составе конъюгата). В результате реакции возникает тройной комплекс АГ-АТ-АГ\*, который потом, как и в предыдущем случае, визуализируется при помощи ферментативной реакции после добавления проявителя.

### **Иммуноферментный анализ для обнаружения антигенов**

Возможны разные варианты ТИФА. Согласно одной из классификаций, ТИФА включает как прямые, так и непрямые методы обнаружения антигенов – в зависимости от того, каким образом обнаруживают анализируемый антиген. Согласно другой

классификации, есть два основных типа ТИФА. Неконкурентный - (если в системе присутствует только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания) и конкурентный метод (если в систему внесены анализируемое соединение и его меченый аналог, конкурирующий за ограниченное число мест специфического связывания).

Определение антигенов при использовании конкурентного ТИФА проводят таким образом. Антитела против определенного антигена иммобилизируют на твердой фазе. Исследуемый материал, который может содержать искомый антиген (например, моча, сыворотка или плазма крови, спинномозговая жидкость и т.д.), вносят в лунки в присутствии тождественного антигена, меченного ферментом. Чем больше антигена содержится в анализируемом образце, тем меньше фермента (конъюгированного с антигеном) свяжется с твердой фазой и тем ниже будет интенсивность окрашивания.

Наиболее распространенный, чувствительный и специфичный вариант ИФА для обнаружения антигенов – это, так называемый, сэндвич-метод. На твердой фазе сорбируют антитела против искомого антигена. В последнее время все чаще используют моноклональные антитела, что дает возможность повысить специфичность метода. Затем в лунки вносят исследуемый материал и конъюгат (моно- или поликлональные антитела, меченные ферментом). Значение оптической плотности образца прямо пропорционально концентрации антигена.

### **Иммуносорбенты**

В тест-системах на основе ТИФА применяются иммуносорбенты, т.е. твердая фаза (чаще всего пластиковые планшеты, нитроцеллюлозные диски) с

нанесенными на нее антигенами или антителами. Антигены, используемые для приготовления иммуносорбента, во многом определяют чувствительность и специфичность иммуноферментной тест-системы. В качестве антигенов используют лизаты очищенных вирионов, бактерий, отдельные фракции белков, выделенных из клеток, где культивировали возбудителя, а также синтетические синтетические пептиды и рекомбинантные полипептиды. Сегодня как антигены для ИФА все чаще используются синтетические пептиды и рекомбинантные белки.

Рекомбинантные, как и синтетические антигены, включают обычно антигенные детерминанты (эпитопы) природных антигенов. Использование рекомбинантных белков и синтетических пептидов имеет то преимущество, что работать с ними намного безопаснее (получая антиген, персонал не контактирует с возбудителем); упрощается ход очистки и повышается частота антигена и, следовательно, специфичность тест-системы [3]. При создании рекомбинантных белков можно получать так называемые слитые (соединенные, сложные) антигены, которые содержат ковалентно связанные фрагменты аминокислотных последовательностей разных белков или участков одного и того же белка, размещенных на разных эпитопах; можно также вносить в лунки планшета точно дозированные количества разных белков.

Технология получения рекомбинантных белков дает возможность получить достаточно очищенный аналог любого антигена. Для создания высококачественной тест-системы на основе рекомбинантных соединений необходимо из большого количества имеющихся антигенов возбудителя отобрать такие, которые характеризуются высокой

иммуногенностью, т.е. способностью вызывать образование значительного количества антител в организме зараженного человека или животного. Желательно, чтобы такие антитела присутствовали в крови заболевших в течение всего периода болезни. Отобранные антигены должны быть высокоспецифичными, характерными только для данного определенного возбудителя, не давать перекрестных реакций с антителами против других возбудителей.

Кроме того, большое значение для специфичности и чувствительности имеет степень очистки рекомбинантных белков от примесей.

### **Твердофазные носители**

Один из важнейших компонентов систем на основе ИФА – это носитель, на поверхности которого происходит реакция. Носители, используемые в ТИФА, должны соответствовать ряду требований, обусловленных особенностями метода: речь идет, прежде всего, о:

- нерастворимости носителя в условиях проведения анализа;
- достаточной сорбционной емкости (она определяется количеством иммобилизованного белка в пересчете на единицу массы или объема носителя);
- минимальной способности к неспецифическому связыванию;
- прочном связывании сорбированных соединений и стабильности препарата при связывании;
- удобстве носителя для анализа в методическом плане, в частности, о

возможности его применения для автоматизированных методов;

- однородности сорбционной емкости на всей поверхности носителя, которая гарантирует воспроизводимость получаемых результатов [4].

Некоторые носители соответствуют указанным требованиям. Для иммобилизации антигенов и антител в ТИФА используют синтетические полимеры – полистирол, полипропилен, поливинил, дакрил и др. Наиболее удобными оказались планшеты из полистирола с 96 лунками. Они позволяют одновременно анализировать большое количество образцов, истратив небольшие количества диагностических препаратов; такие планшеты легко промывать; для внесения образцов и реагентов на планшеты применяют автоматические дозаторы.

Связывание иммунореагентов с твердой фазой достигается двумя основными путями:

- во-первых, за счет пассивной сорбции, которая происходит благодаря гидрофобным, донорно-акцепторным или водородным связям. Связывание зависит от концентрации белка, рН, ионной силы, состава раствора, температуры и свойств самого носителя, что существенным образом влияет на точность и воспроизводимость результатов ТИФА;
- во-вторых, методом ковалентного связывания, которое основано на том, что реакционно-способные гидроксильные, амидные или карбоксильные группы твердой фазы ковалентно связываются со специфическим реагентом.

Как твердофазный носитель в тест-системах чаще всего используют полистироловые микропланшеты с плоским дном и заранее определенной сорбционной емкостью. Это обычно или монолитные планшеты с 96 лунками, или стрипы (т.е. отдельные ряды планшета), которые содержат 8, 12 или 16 лунок. Для ТИФА используют планшеты, лунки которых имеют плоское дно. Сейчас для производства тест-систем на предприятии “Диапроф-Мед” используют планшеты производства фирмы Nunc (Дания), которые по своей сорбционной емкости подразделяются на типы PolySorp, MediSorp и MaxiSorp.

Пластик MaxiSorp имеет повышенную сорбционную емкость благодаря специальной обработке его поверхности; на ней можно сорбировать белки и другие молекулы, содержащие как гидрофильные, так и гидрофобные области, например, антитела. Теоретически подсчитано, что этот тип пластика максимально связывает  $650 \text{ нг/см}^2$  белка. Планшеты типа MediSorp с сорбционной емкостью  $400 \text{ нг/см}^2$  также предназначены для связывания белков, имеющих и гидрофильные, и гидрофобные области; в частности, эти планшеты рекомендуют применять для связывания иммуноглобулинов класса G. У планшетов типа PolySorp сорбционная емкость ниже и теоретически не превышает  $220 \text{ нг/см}^2$ ; на них хорошо связываются гидрофобные белки [5].

Различия в сорбционной емкости обусловлены составом носителя и технологией его производства. Отличаются между собой не только планшеты разных типов; иногда сорбционная емкость значительно колеблется в пределах одного и того же типа планшетов; могут быть значительные отклонения между лунками

одного и того же планшета, влияющие на воспроизводимость результатов ТИФА (см. ниже).

### **Иммобилизация антигенов или антител**

При изучении процесса сорбции необходимо различать сорбционную способность внесенных веществ и сорбционную емкость носителя. Первая обусловлена пространственной структурой молекулы, которая, в свою очередь, зависит от природы вещества (белка, липопротеина, углевода и т.д.), рН, ионной силы буфера, на котором разводят антигены или антитела (чаще всего используют карбонатный буфер, рН 9,6, если он не изменяет конформации иммобилизованных молекул); концентрации и степени чистоты материалов, засорбированных в лунках планшета; времени и температуры инкубации, а также от способов высушивания и герметичности упаковки (запаивания) планшетов.

Связывание материала с твердой фазой достигается путем «пассивной» сорбции: раствор соответствующего антигена или антител вносят в лунки планшета на несколько часов. При этом связывание материала с поверхностью носителя обеспечивается благодаря гидрофобным взаимодействиям. После такого нанесения излишек внесенного материала удаляют; в ряде случаев планшеты, во избежание последующего неспецифического связывания, обрабатывают блокирующими растворами. Связывание с носителем зависит от концентрации нанесенного белка. Оптимальная концентрация белка для покрытия твердой фазы составляет 1-10 мкг/мл [6].

Доля вещества, связавшегося с носителем, прямо зависит от времени и температуры, при которой



происходит сорбция. Так, за одинаковое время при температуре 37 °С на поверхности полистирола связывается примерно вдвое больше белка, чем при 4 °С. Кроме того, если сорбция происходит всего только три часа, то уровень ее не превышает 80 % от максимального значения, наблюдаемого после 18-24 ч инкубации.

### **Конъюгаты, используемые в ИФА**

Конъюгаты в широком значении этого слова – это искусственные структуры, полученные в результате химического сшивания двух или более различных молекул. Для проведения ИФА применяют конъюгаты, содержащие антитела, обычно противовидовые, и фермент. Иногда вместо противовидовых конъюгатов используют А-белок золотистого стафилококка, который связывается с Fc-фрагментом первого антитела в образовавшемся комплексе.

Для ковалентного пришивания индикаторного фермента к антителам предложено несколько различных методов. Сегодня наиболее популярны различные модификации метода периодатного окисления; данный метод подходит для ферментов, содержащих углеводные остатки, как, например, пероксидаза.

Сравнительно высокая стабильность конъюгатов, содержащих фермент – это одно из важнейших преимуществ методов ИФА над радиоиммунным анализом. В присутствии стабилизаторов конъюгаты способны сохранять свою активность в течение 1-2 лет.

Важное условие успешного проведения ИФА – соответствующая концентрация конъюгата. Определение оптимальной концентрации конъюгата – это одна из главных задач производства. При слишком высокой концентрации конъюгата наблюдается его избыточное

неспецифическое связывание с носителем, что значительно повышает значение ОП, включая и повышение фона. При слишком низких концентрациях конъюгата чувствительность анализа может заметно снижаться в результате замедленного превращения субстрата в продукт [7].

### **Субстраты и хромогены**

Одно из биологических явлений, лежащих в основе ИФА – высокая каталитическая активность ферментов-индикаторов, используемых в ИФА. Эти ферменты должны:

а) иметь значительную удельную каталитическую активность, что позволяет обнаруживать ферментную метку в низких концентрациях;

б) быть доступными в достаточно очищенной форме и сохранять высокую ферментативную активность после химической модификации при получении конъюгата с антителами или антигенами;

в) быть стабильными при оптимальных условиях взаимодействия антигена с антителом;

г) количественно определяться при помощи простых и чувствительных методов [8].

Поскольку фермент взаимодействует с субстратом специфически, выбор субстрата и хромогена зависит от фермента-метки. Основные требования к субстрату – обеспечение чувствительности метода при обнаружении фермента, входящего в состав конъюгата; используемый хромоген должен обеспечить образование ярко окрашенных продуктов реакции фермент-субстрат. Проявитель (смесь субстрата с хромогеном) при работе на планшетах должен давать полностью растворимые продукты с высоким коэффициентом поглощения

(экстинкции), т.е. высокую интенсивность окрашивания на единицу использованного субстрата.

Поэтому в ИФА чаще всего используют пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и  $\beta$ -D-галактозидазу. Во всех трех случаях концентрации получаемых продуктов определяются на уровне пикомолей ( $10^{-12}$ ). Щелочной фосфатазе и ее конъюгатам присущи высокая стабильность и низкий порог выявления, однако этот фермент довольно дорог. Изредка в коммерческих тест-системах на основе ИФА используют также  $\beta$ -D-галактозидазу. Но чаще всего в состав конъюгатов включают пероксидазу хрена.

Субстратом для пероксидазы служит перекись водорода. Фермент содержит легко окисляемые периодатом углеводные остатки, через которые фермент легко пришить к антителам или антигенам. Активность фермента в ИФА можно легко регистрировать фотометрически, флюорометрически (индикаторная система – п-оксифенилпропионовая кислота), хемилюминесцентным (индикаторная система –  $H_2O_2$ , люминол, п-иодфенол) и электрохимическим методами. При количественном фотометрическом определении продукта, образующегося под действием пероксидазы, в состав проявителя вносят вещества (хромогены), образующие окрашенные соединения под воздействием атомарного кислорода, высвобождаемого пероксидазой из перекиси водорода. Среди таких веществ следует назвать ортофенилендиамин (ОФД), тетраметилбензидин (ТМБ), 2,2'-азинобис-(3-этилбензтиазолин)-6-сульфоновую кислоту (АБТС), диаммонийную соль этой кислоты и др.

Продукт окисления ОФД максимально поглощает свет при длине волны 435 нм. Однако при добавлении в реакционную смесь серной кислоты для остановки реакции максимум спектра поглощения сдвигается на

50 нм в длинноволновую область, поэтому регистрацию ОП производят при 492 нм.

Широкое применение в ТИФА получил хромоген ТМБ, т.к. его метаболиты, по сравнению с другими хромогенами, не проявляют мутагенного или канцерогенного действия. Голубое окрашивание, возникающее в результате реакции, хорошо контрастирует с фоном и позволяет достичь высокой чувствительности анализа в тех случаях, когда реакцию учитывают визуально. ОП окрашенных продуктов при использовании ТМБ определяют при длине волны 450 нм после добавление в реакционную смесь стоп-реагента.

Хромоген АБТС в присутствии пероксидазы и перекиси водорода образует стабильный катион-радикал, окрашивающий раствор в зелено-голубой цвет. Основные преимущества АБТС по сравнению с другими хромогенами – возможность проводить реакцию при освещении и не останавливать ферментативную реакцию. Измерения ОП производятся при длине волны 405-414 нм [9].

Учет результатов ИФА, как уже упоминалось, можно провести визуально и инструментальными методами, хотя очень нежелательно прибегать к визуальной оценке. При крайней необходимости (при отсутствии ридера) следует удостовериться, что интенсивность окрашивания в реакции между всеми положительными и отрицательными контрольными образцами четко и существенно отличается.

Более информативные результаты получают при инструментальной регистрации ОП. В этом случае необходимо постоянно калибровать ридеры (спектрофотометры) – устройства, измеряющие ОП окрашенных продуктов реакции. Чтобы не требовалось постоянно калибровать приборы, можно производить

измерения ОП при двух длинах волн – основной, при которой суммарно регистрируется ОП окрашенных продуктов и полистирола, и референс-волне, когда регистрируется лишь ОП носителя. Истинный результат получают, отняв второе значение от первого.

Большинство современных ридеров автоматически осуществляют эту операцию, если измерения проводятся при двух длинах волн.

### **Типы иммуноферментных тест-систем**

Современные иммуноферментные тест-системы в большинстве случаев представлены различными модификациями ТИФА с использованием разнообразных схем проведения реакции и множества самых различных конъюгатов.

В самых первых коммерческих тест-системах, предложенных для определения антител против возбудителей инфекционных заболеваний (и от такого типа тест-систем пока еще полностью не отказались), на твердую фазу наносят природные антигены, полученные из лизатов очищенных вирусов и бактерий, а также отдельные фракции специфических белков, выделенных из зараженных клеток. В качестве конъюгата берут противовидовые антитела, меченные ферментом.

Недостатки таких тест-систем – использование опасных инфекционных материалов в качестве антигенов; это усложняет производство тест-систем, т.к. приходится культивировать, выращивать и обеззараживать вирусы или бактерии. На предприятии НПК «Диапроф-Мед» производят системы такого типа (на основе природных антигенов) для определения IgG человека против возбудителя токсоплазмоза, вируса краснухи и вирусов герпеса простого типов 1 и 2 (“DIA-

Тохо-IgG”, “DIA-Rubella-IgG” и DIA-HSV1/2-IgG, соответственно). На этом принципе основываются также тест-системы ветеринарного назначения для обнаружения антител против возбудителей бычьего туберкулеза, бруцеллеза и лептоспироза в сыворотках крови крупного рогатого скота. На рисунке 1 подана принципиальная схема такой модификации ИФА.

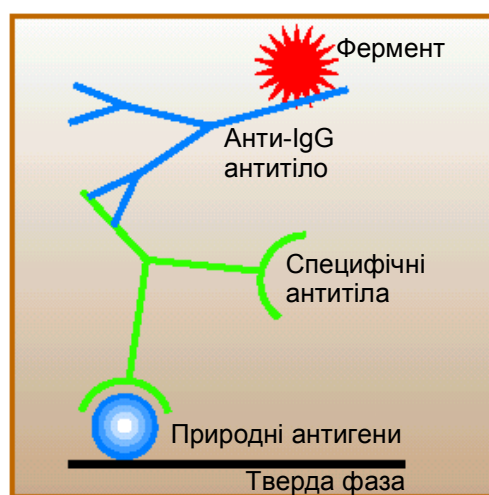


Рис. 1

В некоторых несколько более совершенных тест-системах тоже используют противовидовой конъюгат (антитела, меченные ферментом), но в качестве антигенов применяются не природные, а рекомбинантные белки. На рисунке 2 представлена принципиальная схема ИФА с рекомбинантными белками, очень сходную с предыдущей.

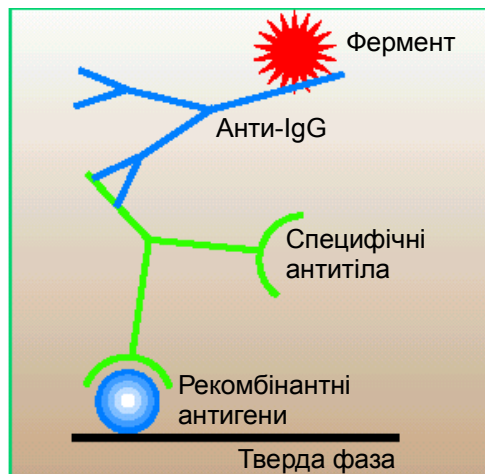


Рис. 2.

На НПК «Диапроф-Мед» выпускают ряд тест-систем на основе рекомбинантных белков; такие тест-системы предназначены для обнаружения антител против вирусов гепатита В и С, цитомегаловируса, возбудителей хламидиоза и сифилиса (“DIA-HBcore”, “DIA-HCV”, “DIA-CMV-IgG”, “DIA-CMV-IgM”, “DIA-Chlamydia”, “DIA-Trep”). Такие тест-наборы более безопасны при их изготовлении и работе с ними.

При дальнейшем усовершенствовании тест-систем рекомбинантные и синтетические антигены не только наносят на твердую фазу, но и вводят в состав конъюгата, пришив их к ферменту вместо противовидовых антител. Это позволяет одновременно обнаруживать иммуноглобулины классов А, М и G, повысить чувствительность и специфичность тест-системы. На рисунке 3 показана схема проведения ИФА при работе с такой тест-системой.

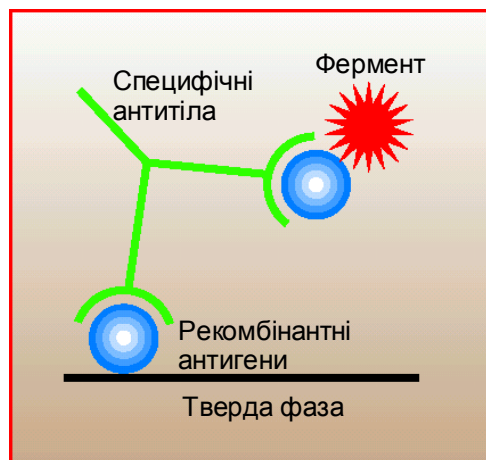


Рис. 3

Предприятие «Диапроф-Мед» выпускает тест-системы с рекомбинатными антигенами в составе конъюгата для выявления антител против вируса иммунодефицита человека (“DIA-HIV”) и возбудителя сифилиса (“DIA-SYPH”).

На современном этапе специалистами предложен еще более совершенный подход – модификация ТИФА для диагностики, например, ВИЛ-инфекции по принципу одновременного определения специфических антител и антигена в сыворотке крови. Такой анализ обнаруживает ВИЛ-инфекцию на 4-8 дней раньше, чем другие тест-системы с рекомбинантными белками в составе конъюгата; более высокая чувствительность данной тест-системы доказана в опытах с использованием наборов сероконверсионных сывороток.

Вообще говоря, в современных тестах часто используют сочетания разных антигенов – смесь рекомбинантных высокоочищенных белков, высокоочищенных нативных антигенов и синтетических пептидов.



Для определения антигенов чаще прибегают к сэндвич-варианту ИФА, принципиальная схема которого представлена на рисунке 4.

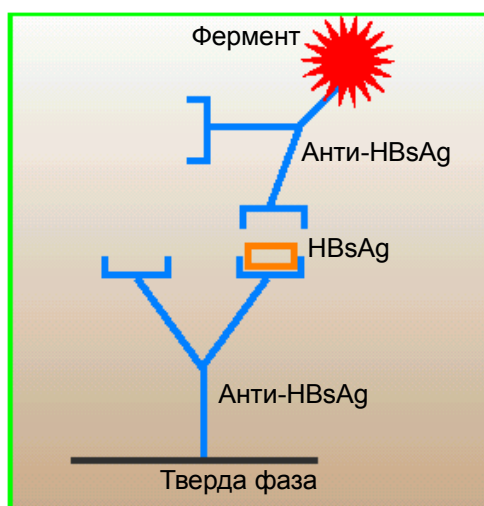


Рис. 4

В этом варианте на твердой фазе сорбируют антитела против исследуемого антигена (сегодня чаще берут для этой цели моноклональные антитела), а в качестве конъюгата используют моно- или поликлональные антитела, меченные ферментом. На этом принципе работает тест-система для определения HBsAg вируса гепатита В (“DIA-HBV”).

Для определения иммуноглобулинов класса М разработана модификация ИФА, так называемая «IgM-ловушка», схема которой представлена на рисунке 5. На этом принципе основаны такие тест-системы НПК «Диапроф-Мед», как “DIA-IgM-SYPH”, “DIA-HSV-IgM”, “DIA-Тохо-IgM” и “DIA-Rubella-IgM”. Моно- или поликлональные антитела против иммуноглобулинов класса М сорбируют на полистироловых планшетах. Исследуемый материал, в котором ищут антитела класса IgM против определенного возбудителя, инкубируют с

анти-IgM на твердой фазе, добавляют после отмывания меченные пероксидазой хрена рекомбинатные белки-аналоги поверхностных антигенов данного возбудителя.

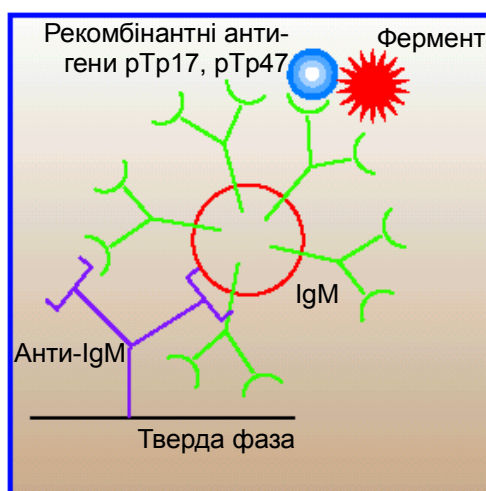
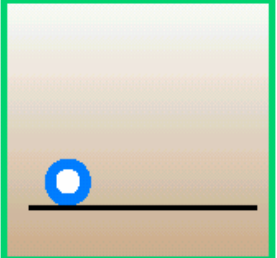
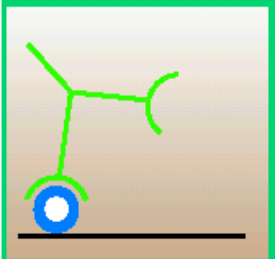
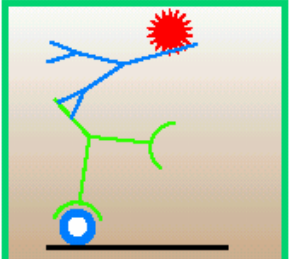
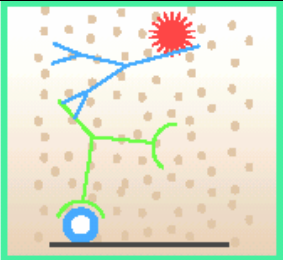


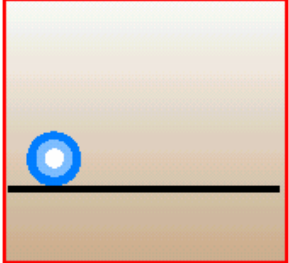
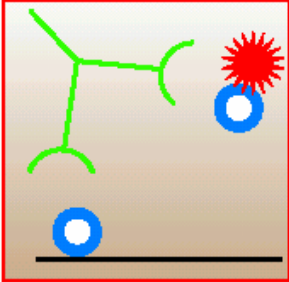
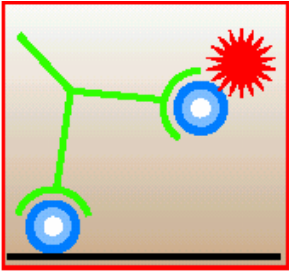
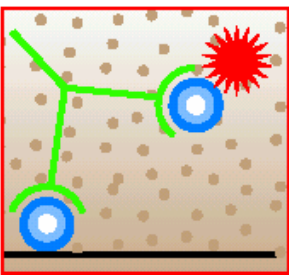
Рис.5

Существует еще множество модификаций ИФА; здесь упомянуты только те, на которых основываются диагностические тест-системы НПК «Диапроф-Мед». Далее мы представим более подробные схемы проведения ИФА, укажем, какое оборудование необходимо для работы, и обсудим ошибки, возможные при проведении анализа и учете полученных результатов.

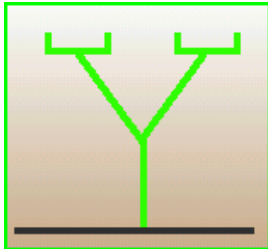
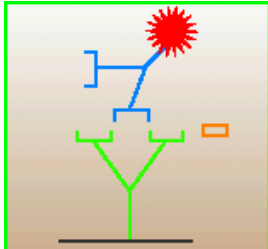
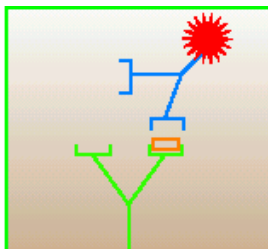
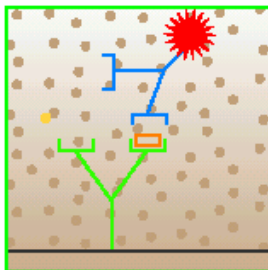
**Схема проведения ИФА на примере  
тест-системы “DIA-HCV”  
Этапы проведения анализа**

<b>Процедура</b>	<b>Формирование комплекса</b>
Полистироловые стрипы, сенсibilизированы рекомбинантными белками	
<p>Внесение в лунки стрипов по 80 мкл раствора для разведения образцов и по 20 мкл контролей и сывороток</p> <p>Инкубация 60 мин при 37 °С – образование комплекса АГ-АТ</p> <p>Промывание лунок буфером 4 раза.</p>	
<p>Внесение в лунки раствора конъюгата.</p> <p>Инкубация 30 мин при 37°С (формирование комплекса с конъюгатом).</p> <p>Промывание лунок буферным раствором (6 раз)</p>	
<p>Внесение в лунки раствора проявителя</p> <p>Инкубация 30 мин (окрашивание)</p> <p>Остановка реакции</p> <p>Регистрация оптической плотности</p>	

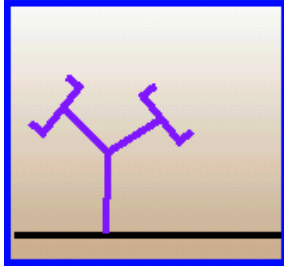
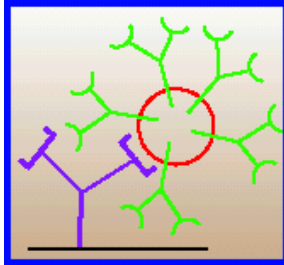
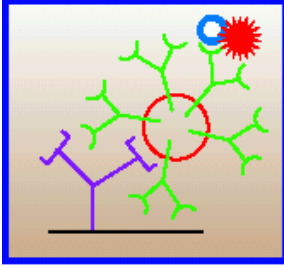
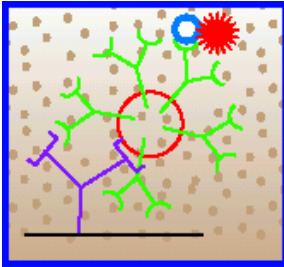
**Схема проведения ИФА на примере  
тест-системы “DIA-HIV”  
Этапы проведения анализа**

Процедура	Формирование комплекса
<ul style="list-style-type: none"> <li>Полистироловые стрипы, сенсibilизированные рекомбинантными белками</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Внесение в лунки по 60 мкл раствора кон'югата и по 30 мкл образцов контролей и сывороток</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Инкубация в течение 90 (60) мин при 37 °С (формирование комплекса АГ-АТ с кон'югатом)</li> <li>Промывание 8 раз буферным раствором</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Внесение в лунки по 100 мкл раствора проявителя</li> <li>Инкубация 30 мин при комнатной температуре (окрашивание)</li> <li>Остановка реакции стоп-реагентом</li> <li>Регистрация оптической плотности</li> </ul>	

**Схема проведения ИФА на примере тест-системы “DIA-HBV” для обнаружения HBs-антигена вируса гепатита В**  
Этапы проведения анализа

Процедура	Формирование комплекса
<ul style="list-style-type: none"> <li>Полистироловые стрипы, сенсibilизированные моноклональными антителами против HBsAg</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Внесение в лунки по 100 мкл образцов контролей и сывороток</li> <li>Внесение в лунки по 50 мкл раствора кон'югата</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Инкубация в течение 120 мин при 37 °С (формирование комплекса АГ-АТ с кон'югатом)</li> <li>Промывание 6 раз буфером.</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Внесение в лунки по 100 мкл раствора проявителя (перекиси водорода и хромогена)</li> <li>Инкубация 30 мин при комнатной температуре (окрашивание)</li> <li>Остановка реакции добавлением стоп-реактента</li> <li>Регистрация оптической плотности</li> </ul>	

**Схема проведения ИФА на примере тест-системы “DIA-Toxo-IgM”  
для определения IgM против токсоплазмы**  
Этапы проведения анализа

Процедура	Формирование комплекса
<ul style="list-style-type: none"> <li>Полистироловые стрипы, сенсibilизированные моноклональными антителами против IgM человека.</li> </ul>	
<p>Внесение в лунки стрипов по 90 мкл раствора для разведения образцов и по 10 мкл образцов контролей и сывороток Инкубация 30 мин при 37 °С (формирование комплекса анти-IgM-IgM). Промывание лунок буфером 4 раза.</p>	
<p>Внесение в лунки раствора конъюгата Инкубация 30 мин при 37°С (формирование комплекса с конъюгатом) Промывание лунок буфером (6 раз)</p>	
<p>Внесения в лунки по 100 мкл раствора проявителя. Инкубация 30 мин при комнатной температуре (окрашивание). Остановка реакции стоп-реагентом Регистрация оптической плотности.</p>	

## **Оборудование, необходимое для работы с иммуноферментными тест-системами**

Лаборатории, где проводят иммуноферментный анализ, должны быть снабжены таким оборудованием:

- набором автоматических пипеток (микродозаторов), в который входят одноканальные пипетки сменного объема, рассчитанные на дозирование 5-40, 40-200 и 200-1000 мкл жидкости, а также 8-канальные пипетки сменного объема на 5-50 и 50-200 мкл;
- набором мерной химической посуды;
- термостатом, рассчитанным на поддержание температуры 37 °С;
- холодильником с морозильной камерой;
- дистиллятором лабораторным для получения дистиллированной воды;
- промывателем для планшетов (вошером);
- спектрофотометром многоканальным (ридером);
- центрифугой для приготовления образцов;
- наконечниками для автоматических пипеток;
- ванночками для рабочих растворов.

## **Требования и рекомендации при проведении исследований методом ИФА**

Корректная постановка анализа достигается при обязательном соблюдении перечисленных ниже условий и требований.

### Качественная подготовка посуды

Посуда должна быть хорошо вымыта с использованием жидких моющих средств, которые не содержат биодобавок, и тщательно промыта проточной, а затем – дистиллированной водой. Посуду, используемую для приготовления раствора проявителя с хромогеном, нельзя мыть моющими средствами. Таковую посуду следует после работы ополоснуть 70 %-ным раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой. Необходимо выделить и промаркировать отдельную посуду для работы с растворами хромогена и конъюгатов.

Особенно высокие требования предъявляются к чистоте посуды и наконечников, которые используются для манипуляций с растворами конъюгатов, поскольку даже незначительное загрязнение может привести к падению активности конъюгата и, как следствие, к повышению фоновых значений и снижению чувствительности проведенного анализа.

### Подготовка исследуемых образцов [10]

Образцы сывороток или плазмы исследуют после осаждения эритроцитов (центрифугирования). Отделение сыворотки от сгустка эритроцитов и фибрина осуществляют таким образом: пробирку с образцом крови ставят в термостат на 30 мин при температуре 37 °С для быстрого формирования сгустка (фибриноген, который не



попал в сгусток, может стать источником ложноположительной реакции в некоторых тест-системах). После инкубации обводят сгусток от стенок пробирки стерильной пастеровской пипеткой и на 1 час ставят в холодильник при температуре 2-8 °С. Пробы центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Такие сыворотки можно хранить 72 часа в холодильнике при 2-8 °С.

Если пробы не удастся проанализировать на протяжении срока, указанного выше, их следует заморозить при минус 20 °С или при более низких температурах. При этом нельзя допускать повторного (более 2-3 раз) замораживания и размораживания проб. Размороженные сыворотки, требующие повторного анализа, не следует снова замораживать.

Образцы сывороток должны быть прозрачными, без признаков гемолиза, выраженной гиперлипидемии (хилеза), бактериемии. Не следует проводить ИФА с пробами неотцентрифугированной крови, а также с сыворотками, куда добавлен азид натрия (ингибитор пероксидазы).

Необходимо исключить возможность перекрестного загрязнения проб из-за попадания даже микроколичеств одного образца в соседнюю пробу, что часто наблюдается при проведении любых манипуляций с сыворотками над штативом с пробирками и над рабочим планшетом. Для каждой пробы необходимо использовать отдельный наконечник.

Во избежание ошибок следует внимательно относиться к маркированию образцов.

### Соблюдение инструкции по применению тест-системы

Как правило, в инструкции указаны основные моменты, существенные для получения правильных результатов при проведении ИФА с использованием данной тест-системы, поэтому инструкцию нужно прочитать внимательно. Практически все тест-системы со временем совершенствуются, это сказывается на изменениях в методиках подготовки реактивов и проведения реакции.

Для разбавления реагентов и промывки приборов необходимо использовать качественную и свежую дистиллированную воду, которая хранится не более 24 час.

запрещено повторно использовать планшеты тест-систем для любых целей. Они после работы обязательно обеззараживаются и утилизируются.

Нельзя использовать компоненты из наборов различных серий, поскольку все компоненты тест-системы и условия проведения анализа (в частности, рабочее разведение конъюгата) определяются производителем для каждой серии наборов.

### Соблюдение инструкции по надлежащей практике работы в помещениях, где хранятся тест-системы и проводятся исследования методом ИФА

Недопустимо присутствие на рабочем месте в лаборатории паров окислителей (открытых емкостей с растворами перекиси водорода, гипохлорита и тому подобное). Нельзя хранить и использовать растворы с хлором в помещениях, где в данный момент проводится исследование методом ИФА.

### Соблюдение сроков и условий хранения наборов

Качественная работа диагностических наборов гарантирована производителем лишь в пределах указанного срока годности и при соблюдении соответствующих условий хранения.

### Общие рекомендации по качественному проведению анализа

Поскольку при постановке ИФА одновременно исследуют большое количество проб, может произойти путаница при их внесении в лунки планшета. Чтобы этого избежать, рекомендуется перед началом анализа заполнить протокол исследования, где на схеме планшета показана планируемая последовательность внесения проб. Такая схема поможет лаборанту сосредоточенно работать. Также рекомендуется использовать дополнительный штатив, чтобы переставлять туда пробирки с отработанным материалом.

Правила работы с автоматическими пипетками представлены ниже в следующем разделе.

Планшет перед внесением сывороток лучше поставить на белый стол или белый лист бумаги. На белом фоне легче следить за изменением цвета в лунках с внесенными сыворотками; снижается вероятность ошибки при внесении компонентов.

При внесении контрольных и исследуемых образцов необходимо осторожно пипетировать смесь в лунках.

Если при внесении анализируемого образца произошла ошибка, например, две сыворотки внесены в одну лунку, необходимо сразу отметить эту лунку как «брак» в протоколе внесения и результат анализа в ней не учитывать.

Реакция связывания антител с антигеном начинается сразу после внесения сыворотки в лунку планшета, поэтому необходимо стараться уменьшить время между началом и окончанием внесения проб.

Последующие манипуляции с планшетом (внесение растворов конъюгата, проявителя и стоп-реагента) нужно проводить с помощью многоканальной пипетки, начиная вносить реагенты с того же ряда, с которого начинали вносить сыворотки.

Закончив работу, следует занести в протокол результаты анализа (вклеить распечатку с принтера ридера). Таким образом, лаборатория получит документ, удобный для хранения информации о проведенном исследовании.

#### Правила работы с автоматической пипеткой [11]

Автоматические пипетки – это дозаторы с регулируемым объемом; они широко используются для взятия и переноса точных объемов жидкости. Принцип действия пипетки – перемещение определенного объема воздуха между поршнем и жидкостью. Для взятия жидкости используют сменные наконечники, которые должны стоять в специальном штативе. У большинства пипеток есть механизм для сбрасывания наконечников.

При работе с автоматической пипеткой необходимо придерживаться следующих правил:

1. Установите нужный объем как указано в инструкции к пипетке.
2. Убедитесь, что наконечник чистый и в нем нет посторонних пластиковых частичек; плотно наденьте его на конус пипетки.
4. В ходе работы держите пипетку вертикально (максимальное отклонение от вертикали  $10^\circ$ ).

5. Для лучшей работы крепко держите пипетку в руке, большой палец должен находиться на операционной кнопке. Последовательность работы при внесении образцов приведена на рисунке 3.

Начальное  
положение

Первый упор

Второй упор

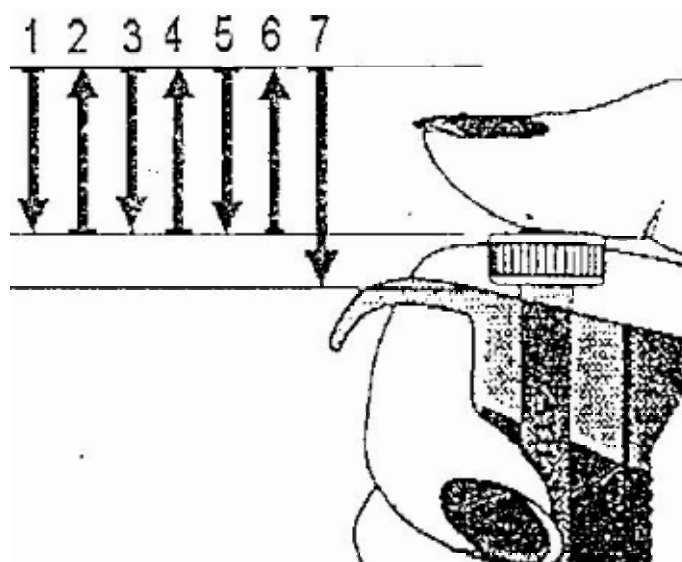


Рис.3

- Опустите наконечник на 2-3 мм в жидкость, нажмите на операционную кнопку до первого упора (рис.3) и плавно отпустите кнопку.

- Не вынимая наконечник из жидкости, осторожно отпустите кнопку в исходное положение.

- Опустите наконечник на 2-3 мм в жидкость, куда необходимо перенести отобранную жидкость, нажмите на операционную кнопку до первого упора. Избегайте касания наконечником стенок и дна лунок (рис.4).

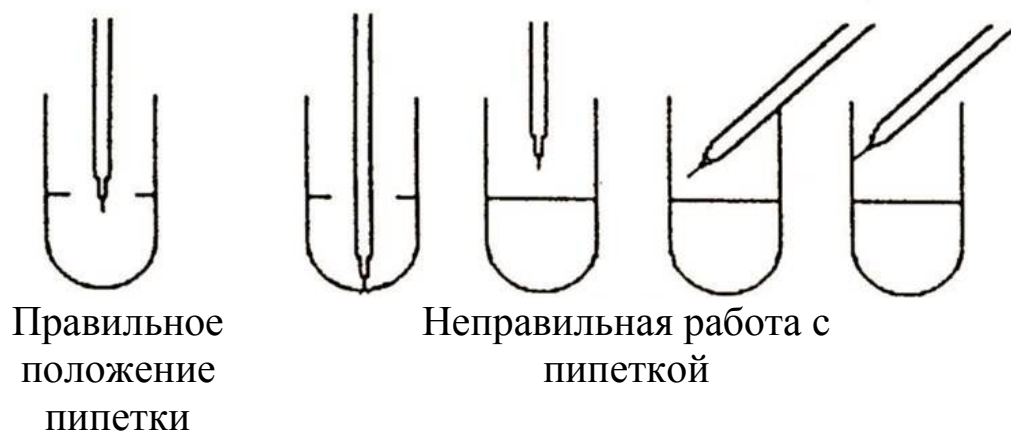


Рис. 4

- В положении, когда наконечник слегка опущен в жидкость, плавно отпустите операционную кнопку (до исходного положения). Таким образом, наконечник наполняют для пипетирования (размешивания). Повторите эту процедуру 2-3 раза.

- Напоследок нажмите на операционную кнопку до второго упора для полного удаления жидкости из наконечника. Вытяните наконечник из жидкости и отпустите операционную кнопку в исходное положение.

- Снимите наконечник с конуса пипетки, не касаясь его, с помощью механизма для снятия наконечников.

- Замените наконечник и продолжайте работу со следующим образцом.

3. При работе с сыворотками или другими биологическими жидкостями тонкая пленка жидкости остается на стенках наконечника, что может изменить пипетируемый объем. Этого можно избежать, если смочить наконечник в пипетируемой жидкости (т.е. правильно перемешать ее, как описано выше) и только после этого набирать нужный объем.

### Температурный режим и время инкубации

При проведении анализа температура в лаборатории должна быть 18-25 °С.

Как правило, инкубация исследуемых сывороток и конъюгата проводится в термостате. Для равномерного прогрева планшетов рекомендуется класть на металлическую полку термостата листок бумаги.

Инкубация проб с раствором проявителя, который содержит хромоген, должна проводиться при комнатной температуре. При этом необходимо знать, что стандартной комнатной температурой считают температуру 18-25 °С. Именно на такую температуру рассчитана продолжительность инкубации, указанная в инструкции. Если температура в комнате ниже 18 °С, ферментативная реакция замедляется, это может привести к снижению чувствительности проведенного анализа. В таком случае рекомендуют проводить инкубацию с проявителем в термостате, настроенном на температуру 20-25 °С.

### Отмывка планшета на каждом этапе проведения ИФА

Режим отмывания на каждом этапе ИФА должен точно соответствовать требованиям инструкции к тест-системе; для разных тест-систем условия промывания могут быть неодинаковыми. Следует иметь в виду, что качество отмывания планшета – один из основных факторов при проведении ИФА, поэтому необходимо очень внимательно относиться к этой процедуре. Необходимо следить за равномерностью заполнения лунок и удаления жидкости из всех лунок планшета. Время между заполнением лунок раствором для

промывания и удалением жидкости должно быть не менее 30 с.

#### Правила работы с конъюгатами и проявителем

Для внесения конъюгата и проявителя следует иметь отдельные, промаркированные для этих процедур микропипетки и ванночки.

Следует исключить возможность контакта проявителя с синтетическими моющими средствами и с хлорамином. Поэтому для работы с проявителем необходимо использовать отдельную посуду и наконечники. Дезинфекцию инструментов и вспомогательных материалов следует проводить 6 %-ным раствором перекиси водорода или 70 %-ным этиловым спиртом.

Недопустим контакт таблеток ОФД и раствора ТМБ, а также раствора готового проявителя с металлами.

Раствор проявителя непосредственно перед употреблением должен быть прозрачным и бесцветным. Планшет с внесенным субстратом и хромогеном необходимо инкубировать в темноте. Остатки раствора в ванночке не рекомендуется выливать до окончания инкубации планшета с проявителем. Хромогенный субстрат, оставшийся в ванночке, не должен изменять цвет в течение 30 мин.; окрашивание проявителя в ванночке свидетельствует о его загрязнении.

#### Периодический контроль работы оборудования

Важным фактором, влияющим на проведение ИФА, является точность работы оборудования. Поэтому следует обязательно проводить периодический контроль работы автоматических пипеток, термостатов, спектрофотометров (ридиров), промывателей.



Автоматические пипетки. Допустимая ошибка при измерении объемов автоматическими пипетками при проведении ИФА – 2 %. Используемые пипетки должны соответствовать диапазонам необходимых объемов. При проведении анализа каждая операция с использованием пипетки должна тщательно контролироваться, поскольку любая неточность или ошибка (особенно при перенесении малых объемов) может оказать влияние на достоверность полученных результатов.

Один раз в год автоматические пипетки должны обязательно проходить метрологическую поверку. Кроме того, необходимо ежемесячно проверять точность работы пипетки гравиметрическим способом. Для этого наконечник плотно насаживают на пипетку. Пипетки сменных объемов устанавливают на средний объем. Следует 5 раз набрать дистиллированную воду, каждый раз взвешивая выпущенную из дозатора каплю на весах с точностью измерения до 0,1 мг. Оценивая точность работы пипетки, исходят из того, что 1 мл дистиллированной воды при комнатной температуре имеет массу 1 г. Если все измерения укладываются в допустимый интервал ( $\pm 2$  % от установленного), то считают, что пипетка пригодна для использования. Если это не так, то пипетку необходимо смазать и настроить или заменить.

Термостаты. Для получения правильных результатов анализа важно также, чтобы термостат поддерживал необходимую температуру, указанную в инструкции к данной тест-системе. Допустимое отклонение ( $\pm 0,2$  °С); при снижении температуры понижается чувствительность проведенного анализа, а при повышении – его специфичность. Показания внешнего термометра, смонтированного в термостат (при наличии такого термометра) иногда могут не

соответствовать истинной температуре на полках прибора. Поэтому необходимо периодически контролировать работу термостата, поместив ртутный термометр в середину камеры термостата, туда, где обычно размещают планшеты.

#### Автоматические промыватели планшетов (вошеры).

Качественное промывание планшета на каждом этапе работы способствует корректному проведению анализа. Все лунки планшета должны равномерно заполняться промывочным раствором в необходимом объеме; затем раствор должен полностью удаляться. Кроме того, необходимо строго и четко придерживаться всех требований, указанных в инструкции к тест-системе, в отношении количества промывок и времени между заполнением лунок и удалением раствора.

Самая частая ошибка – загрязнение остатками солей, кусочками марли или ваты каналов промывателя или пространства между иглками. Последнее случается реже. Из-за такого загрязнения раствор может попадать из одной лунки в другую.

В ходе промывания необходимо следить за равномерностью заполнения всех лунок планшета и удаления из них жидкости. Кроме того, следует периодически проверять объем заполнения лунок, используя пипетку, настроенную на нужный объем.

Чтобы избежать неудовлетворительной работы автоматических и ручных промывателей, необходимо ежедневно после окончания работы промывать их дистиллированной водой, не допуская образования осадка солей промывочного раствора и загрязнения каналов промывной системы. Один раз в неделю следует обеззараживать промыватель 30 %-ным раствором этилового спирта, а потом 5 раз промыть дистиллированной водой.

## Спектрофотометры многоканальные (ридеры, иммуноферментные анализаторы)

Спектрофотометры используются, для автоматической регистрации результатов иммуноферментного анализа, поэтому необходимо периодически (1 раз в год) проводить метрологический контроль. Метрологическая поверка обеспечивает правильность полученных результатов.

В ежедневной практике ИФА следует помнить о том, что для выхода на рабочий режим прибор должен прогреться (время прогрева для каждого конкретного прибора указано в инструкции к прибору). Существуют простые приемы для проверки точности работы спектрофотометра.

Чтобы проверить воспроизводимость спектрофотометрической оценки результата в каждой лунке планшета, необходимо несколько раз повторить определение ОП в одних и тех же лунках планшета.

Чтобы оценить равномерность результатов измерения по всей поверхности планшета, следует во все лунки пустого чистого планшета внести одинаковый объем окрашенного раствора. Такой раствор можно приготовить, добавив к раствору проявителя (приготовленного согласно инструкции к тест-системе) небольшое количество пероксидазного конъюгата. Количество конъюгата при этом подбирают эмпирически, так чтобы ОП полученного окрашенного раствора находилась в интервале от 0,3 до 1,0 оптической единицы (ОЕ). После внесения такого раствора во все лунки планшета и добавления стоп-реактива проводят спектрофотометрическое измерение ОП. Отклонение от среднего результата измерения в пределах одного планшета не должно превышать 5 %.

Для более корректной оценки результатов ИФА необходимо работать на ридере в двухволновом режиме (492 нм относительно 620 нм для проявителя с ОФД и 450 нм относительно 620 нм для ТМБ). При основной длине волны определяют ОП конечных продуктов ферментативной реакции в пробе, а при отсекающей – ОП планшета (полистирола). В двухволновом режиме ридер фиксирует разницу между ОП при основной и отсекающей длинах волн.

#### Действия при неожиданных нарушениях рабочего режима

В случае неисправности спектрофотометра или при отсутствии света возможный выход для сохранения результатов ИФА – быстрое замораживание планшета с образцами после добавления стоп-реагента в раствор проявителя с последующим быстрым размораживанием при комнатной температуре перед измерением ОП на следующий день. Следует учитывать, что ОП все же возрастет, а относительный прирост сигнала будет больший для небольших значений ОП.

Если термостат не обеспечивает необходимой температуры, следует прекратить работу. Самая распространенная ошибка – проведение ИФА при пониженной температуре с увеличением времени инкубации. Однако различные тест-системы реагируют на снижение температуры и изменение продолжительности инкубации по-разному, поэтому однозначной рекомендации относительно работы при неисправном термостате нет.

### **Учет результатов ИФА**

В тех случаях, когда существует стандартный образец очищенного антигена, для определения концентрации данного антигена в исследуемой пробе готовят стандартные растворы с точно известной концентрацией антигена и строят калибровочную кривую. Пользуясь этой кривой, можно рассчитать концентрацию исследуемого антигена (в нг/мл или в молях/л), зная ОП исследуемой пробы. Концентрация же неочищенного антигена выражается в относительных величинах – титрах, которые выражают степень разведения антигена.

Чтобы корректно проводить определение антител (или антигенов) в испытуемых сыворотках, устанавливают пороговый уровень ОП (т.е. фоновый уровень, так называемое граничное значение – ГЗ, или cut off), измеряемое на отрицательных образцах. Для этого рассчитывают среднее значение сигнала отрицательных сывороток и вычисляют стандартное отклонение ( $\sigma$ ) (см. ниже). Превышение величины сигнала для исследуемой сыворотки на 2-3 ( $\sigma$ ) позволяет считать эту сыворотку положительной.

В большинстве коммерческих тест-систем при определении ГЗ к среднему значению ОП отрицательных контрольных сывороток добавляют константную величину, которая соответствует 2-3  $\sigma$  отрицательных сывороток (обычно рассчитывают стандартное отклонение величин ОП для 40 и более отрицательных сывороток).

### **Оценка диагностических характеристик иммуноферментной тест-системы [12]**

Основные диагностические характеристики иммуноферментной, как и любой другой тест-системы – это ее чувствительность, специфичность и

воспроизводимость получаемых результатов, которые свидетельствуют о надежности (информативности) оцениваемой тест-системы.

Таким образом, эти характеристики – основные медицинские критерии при выборе диагностикума, которые в совокупности своей (комплексно) определяют его информативную диагностическую ценность.

При работе с тест-системами получают как правильные (истинные) положительные и отрицательные результаты, так и иногда ошибочные – ложноположительные и ложноотрицательные результаты. Ложноположительный результат – это ошибочный положительный результат, полученный в данной тест-системе для пробы, которая в действительности отрицательная. Наоборот, ложноотрицательный результат – это ошибочный отрицательный результат, полученный в данной тест-системе для пробы, которая в действительности положительная.

Определение чувствительности и специфичности тест-систем, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, CDC (Centers for Disease Control and Prevention), FDA (USA Food and Drug Administration), осуществляют, оценивая способность диагностикумов обнаруживать положительные и отрицательные сыворотки в стандартных контрольных наборах сывороток. При этом образцы сывороток положительных контрольных наборов должны быть представлены во всем диапазоне иммунореактивности – от сывороток с ранней сероконверсией до сывороток лиц с клинической картиной заболевания. Показатель специфичности тест-систем определяют при исследовании рандомизированной выборки сывороток доноров крови (random blood donors), лиц, которые принадлежат к группам высокого риска инфицирования возбудителем, и

больных с другими патологиями. При этом принимаются во внимание показатели первичной (IR, initial reactive) и повторной (RR, repeat reactive) реактивности положительных сывороток, полученных в этой тест-системе, с последующей верификацией результатов.

Довольно часто при использовании стандартных охарактеризованных панелей сывороток чувствительность и специфичность иммунодиагностикомов приближаются к 100 %, но достичь таких показателей в условиях повседневной лабораторной работы невозможно. Взаимозависимость между чувствительностью и специфичностью такова, что улучшение одного показателя сопровождается ухудшением другого. Таким образом, не существует диагностикума, который бы гарантировал абсолютную чувствительность и специфичность при проведении массовых обследований.

Чувствительностью называют показатель, который выражает долю положительных ответов при наличии данной патологии, т.е. количество зараженных лиц, которые могут быть обнаружены при использовании данной тест-системы:

$$\text{Чувствительность} = \frac{П}{П + ХН} \times 100 \%,$$

где П – количество положительных результатов ИФА, ЛО – количество ложноотрицательных результатов ИФА.

Специфичностью называют показатель, характеризующий способность тест-системы определять только тот компонент, который она должна определять; таким образом, мы должны получать отрицательный результат теста при условии отсутствия патологии:

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

где  $O$  – количество отрицательных результатов ИФА, ЛП – количество ложноположительных результатов ИФА.

Таким образом, более чувствительной будет та тест-система, которая дает меньшее количество ложноотрицательных результатов, а более специфичной – та, которая дает меньшее количество ложноположительных результатов.

Следующий научный критерий выбора диагностикумов – показатель воспроизводимости, который включает:

- близость результатов анализа, проводимого в разных условиях (степень совпадения повторных определений для того же образца в разное время, в разных лабораториях, руками разных сотрудников одной и той же лаборатории и т.д.); различают, в частности, воспроизводимость внутрисерийную, межсерийную и межлабораторную;

- число сывороток, которые одинаково реагируют в двух постановках;
- мера соответствия результатов повторных исследований тех же образцов.

Количественно воспроизводимость можно оценить по расхождениям результатов. Статистически этот показатель выражается величиной так называемого стандартного, или среднего квадратичного отклонения –  $\sigma$  (SD, standard deviation). Эту величину необходимо знать для подсчета граничного уровня ОП (как сказано выше,  $ГЗ = ОП + 3 \sigma$ ) и коэффициента вариации (coefficient of variation, CV).

Вычисление среднеквадратичного отклонения



Значение  $\sigma$  высчитывают по формуле:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{(n-1)}}, \quad d = X_i - X_{cp}$$

где  $d$  – разница между отдельными показателями ОП и средней арифметической величиной ( $X_i - X_{cp}$ );  $n$  – количество исследованных сывороток;  $X_i$  – значение ОП отдельной сыворотки;  $X_{cp}$  – среднее арифметическое значение ОП всех исследованных образцов.

Поскольку при исследовании сывороток показатель  $\sigma$  дает обобщенную характеристику колебаний всех вариантов ОП для данного диагностикума, то для сравнения показателей разных тест-систем, а также для определения внутрисерийных и межсерийных отклонений рекомендуют пользоваться коэффициентом вариации (CV, coefficient of variation) – относительной мерой расхождения результатов, выраженной в процентах.

Коэффициент вариации между лунками одного планшета и между планшетами вычисляют по формуле:

$$CV = \frac{\sigma}{X_{cp}} \times 100 \%,$$

где  $\sigma$  – среднеквадратичное отклонение,  $X_{cp}$  – среднее арифметическое значение ОП всех исследованных образцов.

Более высокое значение CV свидетельствует о больших колебаниях признака (в данном случае – ОП) в исследованной совокупности образцов. Величины, характеризующие показатель воспроизводимости – стандартное отклонение ( $\sigma$ ) и внутрисерийные и междусерийные отклонения (CV) – высчитываются при

исследовании стандартных наборов положительных сывороток с разными уровнями антител против возбудителя (низко- средне- и высокотитражных сывороток). Кроме того, исследуют показатели отрицательных и положительных контролей тест-системы (не менее чем 20 повторов для каждого). При этом CV стандартных отклонений от среднего значения положительных и отрицательных контролей не должен превышать 20 %, а согласно требованиям фирмы Nunc – 10 %.

Кроме основных диагностических характеристик тест-систем, необходимо принимать во внимание и другие показатели, в частности, стабильность (устойчивость против влияния различных факторов среды), простоту проведения анализа, стоимость тестов, т.е. учитывать экономические критерии выбора. Для того чтобы определить эти критерии, необходимо провести развернутое, тщательно спланированное исследование работы тест-систем в условиях их использования. На практике преимущество имеют тест-системы с оптимальными показателями диагностической ценности, с учетом эпидемической ситуации в конкретном регионе, в определенной популяции; принимаются во внимание также экономические соображения.

Показатели чувствительности и специфичности – это величины постоянные, заданные; они не меняются в зависимости от уровня распространенности заболевания в популяции. Показатель, который описывает зависимость результатов исследования от распространенности инфекции и от качественных характеристик диагностикума (т.е. от его чувствительности и специфичности) – это прогностическая ценность теста (predictive value). Прогностическая ценность положительного теста или позитивное прогнозируемое

значение результатов теста (ППЗ) – это вероятность того, что лица с положительными результатами скринингового анализа действительно содержат антитела против возбудителя:

$$\text{ППЗ} = \frac{\text{Действительно положительные результаты ИФА}}{\text{Действительно положительные} + \text{ложно-положительные}} \times 100 \%$$

Прогностическая ценность отрицательного теста, или негативное прогнозированное значение (НПЗ) – это вероятность того, что лица с отрицательными результатами тестирования действительно не содержат антител против возбудителя:

$$\text{НПЗ} = \frac{\text{Действительно отрицательные результаты ИФА}}{\text{Действительно отрицательные} + \text{ложно-отрицательные}} \times 100 \%$$

Таким образом, прогностическая ценность теста, кроме чувствительности, специфичности, прогнозируемой распространенности инфекции, зависит также и от количества правильных результатов диагностики (и положительных, и отрицательных) по сравнению с ошибочными. Чем выше уровень распространения инфекции среди населения, тем выше вероятность того, что лицо с положительным результатом тестирования действительно инфицировано (т.е. тем

выше значение ППЗ). При распространении инфекции доля образцов сывороток с ложноположительными результатами тестирования снижается, а вероятность того, что лицо с отрицательными результатами тестирования действительно не инфицировано, уменьшается. Таким образом, при обследовании лиц, принадлежащих к контингентам со значительным распространением инфекции, большую пользу принесут диагностикумы с высоким значением ППЗ. Если вероятность инфекции низка, то возрастает ценность тест-систем с высоким показателем НПЗ. Вычисления ППЗ и НПЗ позволяют, с одной стороны, оценить, какой диагностикум имеет преимущества при использовании в конкретной эпидемической ситуации в определенном регионе, а вместе с тем рассчитать, сколько тестов необходимо для подтверждения результатов первичного скрининга.

### **Преимущества и недостатки диагностикумов на основе ИФА**

Метод ИФА ценен прежде всего благодаря его высокой чувствительности (отдельные его модификации позволяют определять до  $10^{-18}$  моль/л антигена) и высокой специфичности (около 100 %). Если при тестировании проб, входящих в состав «негативной выборки», для какой-то пробы получен положительный результат, то прежде чем считать его ложноположительным, следует провести дополнительные исследования. Так же необходимо поступить, получив отрицательный результат при тестировании проб(ы) из «положительной выборки».

Количество ложноположительных результатов при обнаружении антител против некоторых возбудителей может колебаться (для разных тест-систем и для разных

контингентов) в пределах от 0,02-0,5 % до 2-40 % всех положительных результатов обследования. Так, по сводным данным, существует около 70 заболеваний или других факторов, приводящих к получению ложноположительных результатов при исследовании серологическими методами. Чем с бóльшим количеством посторонних антигенов и возбудителей контактирует обследуемое лицо, тем выше вероятность получить ложноположительный результат. Приведем некоторые примеры, доказывающие это утверждение.

Ложноположительный ответ в серологической реакции может быть вызван наличием в пробе каких-то «природных антител» против неизвестных антигенов; из-за таких антител возникают перекрестные реакции. В ряде случаев доказано, что причиной таких результатов оказалась так называемая антигенная мимикрия<sup>1</sup>. Так, например, известны ложноположительные реакции на антитела против ВИЧ у лиц, больных шистозоматозом, т.к. обнаружены тождественные Эпитопы у очень отдаленных представителей живого мира – гельминта *Schistosoma mansoni* и ВИЧ-1.

Идентифицирован общий для обоих видов В-эпитоп, состоящий из 14 аминокислот. Моноклональные антитела против этого эпитопа взаимодействуют и с поверхностным антигеном *Sch.mansoni*, и с ВИЧ-1 (с его

---

<sup>1</sup> Антигенная мимикрия – случаи наличия у белков разного происхождения очень сходной или совершенно тождественной первичной аминокислотной последовательности ( и структуры). Такая мимикрия может возникнуть благодаря горизонтальной передаче генетической информации (например, через вирусы, плазмиды или в ходе так называемой генетической трансформации у бактерий).

регуляторным белком Vif). Есть немало случаев присутствия в сыворотках крови антител против родственных вирусов или микроорганизмов. Например, положительный результат при исследовании на антитела против ВИЧ можно получить при наличии в организме других ретровирусов; положительный ответ на присутствие антител против сифилиса возможен, например, при таких инфекциях, как болезнь Лайма (боррелиоз, или клещевой спирохетоз) и далекая от нас болезнь содоку (вызванная заражением при укусе крысы из-за передачи от крысы к человеку возбудителя содоку *Spirillum minus*).

Другие возможные причины:

- прогревание исследованных сывороток,
- наличие в сыворотках антител против углеводов,
- случаи пассивной иммунизации (это особенно касается препаратов антител, изготовленных до 1985 г.),
- высокие уровни антител и иммунных комплексов, циркулирующих в крови,
- наличие аутоантител (например, ревматоидного фактора, аутоантител против коллагена и т.д.) при многочисленных аутоиммунных заболеваниях, патологических процессах, которые вызывают поликлональную активацию лимфоцитов,
- при злокачественных опухолях, иммунодефицитных состояниях, беременности, высоком содержании липидов и билирубина в исследуемых сыворотках,
- постановке реакции с гемолизированными сыворотками<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> При работе с пероксидазой это происходит из-за так называемой “псевдопероксидазной активности гемоглобина”.

Из приведенных данных следует, что ИФА может быть весьма полезным вспомогательным подходом при постановке диагноза, но клиницист обязан принимать во внимание и много других обстоятельств, кроме данных лабораторного анализа. Только всестороннее обследование больного и внимание ко всем данным анамнеза позволяет корректно поставить диагноз и начать правильное лечение.

### **Сравнение тест-систем**

Как правило, тяжело оценить все доступные тест-системы определенного назначения, а поэтому обычно просто сравнивают чувствительность и специфичность двух-трех тест-систем разного производства, чтобы выбрать лучшую из них.

Чтобы сравнить две тест-системы по их чувствительности и специфичности, следует использовать определенные наборы сывороток (например, панель А); анализ сывороток в обеих тест-системах должен провести один сотрудник. Если возможно, стоит, чтобы исследование повторил на следующий день другой сотрудник. Затем следует провести исследование сывороток уже другого набора (например, панели В), полученного от другого производителя. Возможные варианты полученных результатов поданы в таблице 1.

В варианте I следует выбрать тест-систему № 1 (ее чувствительность и специфичность показаны выше).

В варианте II необходимо провести проверку на добавочных панелях (чувствительность и специфичность

тест-системы № 3 оказались выше при проверке при помощи панели А и ниже – при проверке на панели В).

В варианте III следует выбрать тест-систему № 5 (чувствительность тест-системы № 5 выше при проверках на обеих панелях, специфичность ее ниже, но при этом разница в чувствительности намного превышает разницу в специфичности).

В варианте IV выбирать трудно. Обычно в таких случаях учитывают другие факторы (особенности инфекции, воспроизводимость результатов и т.д.).

Таблица 1. Сравнение тест-систем с целью выбора

Вариант	Тест-система, №	Панель сывороток	Чувствительность %	Специфичность, %
I	1	A	98	96
		B	96	96
	2	A	94	95
		B	92	96
II	3	A	98	96
		B	94	92
	4	A	93	91
		B	95	96
III	5	A	98	92
		B	95	91
	6	A	82	98
		B	85	98
IV	7	A	98	92
		B	95	91
	8	A	94	96
		B	90	96



## Типичные ошибки при сравнении тест-систем, оценке чувствительности и специфичности

**Пример 1.** При помощи тест-системы № 1 проверяют большой контингент больных (например, 1.000); сыворотки 40 больных признаны положительными. Пробы, давшие положительный результат в тест-системе № 1 (40 проб), исследуются в тест-системе № 2; в этой тест-системе 30 сывороток из 40 признаны положительными, а 10 – отрицательными; затем те же сыворотки передаются для подтверждения методом К, в котором положительными признаны 30 сывороток.

*На основании этих данных делается ошибочный вывод о том, что специфичность тест-системы № 1 составляет 75 % ( $30/40 \times 100\%$ ), а специфичность тест-системы № 2 - 100 % ( $30/30 \times 100\%$ ); значит, тест-система № 2 лучше, чем тест-система № 1.*

Подобные выводы можно порой находить в докладах научных конференций и в научных публикациях.

*На самом же деле специфичность тест-системы № 1 составляет 98,9 % -  $960/(960+10) \times 100\%$ . Что касается тест-системы № 2, то здесь что-либо сказать трудно, т.к. при ее помощи исследовали всего 40 проб.*

Если заболевание мало распространено и пробы брали у случайных больных (не в группе риска), то можно предположить, что из 1.000 обследованных больных не менее чем 950 здоровы. Тогда из 950 здоровых лиц тест-система № 1 признала здоровыми 940 (10 человек ошибочно признаны больными, что не подтвердилось методом К); таким образом, специфичность тест-системы не ниже 98 % ( $940/950 \times 100\%$ ). Что можно сказать о тест-системе № 2? По имеющимся данным можно оценить ее

чувствительность. Тест-система № 2 признала больными 30 человек, которые были такими признаны при использовании тест-системы № 1 и методом К; таким образом, чувствительность тест-системы № 2 приближается к 100 %. Если бы при помощи тест-системы № 2 проверили всех 1.000 пациентов, то можно было бы сравнивать специфичности обеих тест-систем. Еще более точные подсчеты можно было бы провести, если бы всех пациентов проверили, применив метод К (референтную тест-систему).

Поэтому на основании приведенных данных можно сделать примерно такой вывод:

«Тест-система № 1 имеет специфичность, превышающую 98 %, а тест-система № 2 – чувствительность около 100 %. При этом следует принять во внимание, что специфичность тест-системы № 1 оценена точнее (на тысяче образцов), чем чувствительность тест-системы № 2 (ее оценили на 30 образцах). Полученные данные не позволяют корректно сравнивать качество тест-систем.

**Пример № 2.** Лаборатория проверяет при помощи панели А чувствительность и специфичность тест-системы № 1. Потом другая лаборатория проверяет, используя ту же панель А, чувствительность и специфичность тест-системы № 2. Можно ли на основании полученных результатов сравнивать тест-системы №№ 1 и 2? Чаще всего этого делать не следует, т.к. лаборатории могут значительно отличаться как по своему оборудованию, так и по квалификации персонала.

**Пример № 3.** При помощи тест-систем №№ 1 и 2 проверяют достаточно большой контингент пациентов. Полученные данные вносят в таблицу, например:

Тест-система, №	Количество проб, признанных	
	Отрицательными	Положительными
1	980	20
2	970	30

На основании табличных данных делается вывод о том, что тест-система № 2 более чувствительна, чем тест-система № 1, а тест-система № 1 – более специфична.

По данным этой таблицы ничего нельзя сказать ни о чувствительности обеих тест-систем, ни об их специфичности, поскольку неизвестно, кто из обследованных болен (инфицирован), а кто здоров. Совершенно реальна ситуация, когда все 20 проб, признанных положительными в тест-системе № 1, взяты от больных людей, которых всего 20 (чувствительность тест-системы № 1 равна 100 %). В то же время из 30 проб, признанных положительными в тест-системе № 2, только 10 взяты от больных, которых всего 20 (чувствительность тест-системы № 2 равна 50 %).

**Пример 4.** Тест-система № 1 при проверке на двух-трех положительных сыворотках дает более высокий сигнал, чем тест-система № 2. Обе тест-системы диагностируют сыворотки как положительные. Делается вывод о том, что тест-система № 1 более чувствительна, чем тест-система № 2.

Такой вывод мало обоснован: вполне вероятно, что на большей выборке аттестованных положительных сывороток тест-система № 2 может правильно диагностировать то же самое или большее количество сывороток, чем система № 1.

## ПРОБЛЕМЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКАТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА

Возникающ ие проблемы	Возможные причины	Способы устранения проблем
1. Высо- кий фон в лунках всего планшета.	1.1. Низкое качество дистиллированной воды	1.1.1. Промыть дистиллятор 10 %-ным раствором соляной кислоты, а потом 5 раз дистиллированной водой 1.1.2. Прокипятить дистиллированную воду в открытом сосуде в течение 10- 15 мин, остудить перед использованием. 1.1.3. Использовать бидистиллированную воду
	1.2. Бактериальное загрязнение воды	1.2.1. Хранить дистиллированную воду в закрытой посуде. 1.2.2. Дистиллированную воду использовать в течение дня.
	1.3. Загрязненный промыватель (вошер).	1.3.1 Почистить головку промывателя с помощью иголки и промыть его 30 %- ным этиловым спиртом, а потом 5 раз дистиллированной водой

	1.4.Использование одной и той же посуды для разных реагентов.	1.4.1.Использовать для каждого реагента отдельную посуду.
	1.5.Наличие и использование на рабочем месте дезрастворов с хлором.	1.5.1.Не использовать и не хранить дезрастворы с хлором в помещениях, где проводятся исследования методом ИФА.
	1.6.Повторное использование наконечников.	1.6.1.Наконечники использовать однократно.
	1.7.Контакт хромогена с металлами (пинцет, скальпель и др.)	1.7.1.Избегать контакта хромогена с металлами.
	1.8.Уменьшено количество циклов промывок планшета.	1.8.1.Промывать планшет согласно требованиям "Инструкции".
	1.9.Закончился срок хранения (пригодности) тест-системы.	1.9.1.Запретить использование тест-системы.
	1.10.Грязная посуда.	1.10.1.Мыть посуду согласно инструкции
	1.11.Увеличена температура или время инкубации	1.11.1.Придерживаться режима инкубации.
2. Высокий фон в отдельных лунках.	2.1.Переливание промывочного раствора из лунок планшета при	Отрегулировать вошер, исключить возможные нарушения.

	промыивании на автоматическом промывателе (вошере).	
	2.2.Использование для анализа гемолизованных образцов.	2.2.1. Повторно взять кровь.
	2.3.Использование цельной крови.	2.3.1. Получить сыворотку. Повторно взять пробу крови.
	2.4.Бактериальное загрязнение пробы.	2.4.1. Повторно взять кровь.
	2.5.Использование одного и того же наконечника для нескольких проб.	2.5.1. Использовать отдельные наконечники для каждой сыворотки.
3. Высокий фон в отдельных рядах	3.1.Повторное внесение проявителя.	3.1.1. Раствор проявителя вносить один раз.
	3.2.Повторное использование наконечников.	3.2.1. Наконечники использовать <u>однократно</u> .
	3.3.Переливание жидкости из одного ряда во второй во время промывания.	3.3.1. Отрегулировать подачу промывочного раствора.
	3.4.Загрязнение конуса автоматической пипетки раствором конъюгата.	3.4.1. Для внесения конъюгата и проявителя иметь <u>отдельные</u> микропипетки. При отсутствии достаточного количества микропипеток нужно после внесения

		конъюгата и снятия наконечников, освободить пипетку от возможных остатков конъюгата и протереть ее фильтровальной бумагой.
4. После внесения проявителя и оконча- ния срока инкубации нет окра- шивания в лунках всего планшета	4.1. Не внесен один из реагентов – конъюгат или проявитель.	4.1.1. Переставить анализ. Внести, в соответствии с Инструкцией, необходимые реагенты.
Нет окраши- вания в отдельных лунках планшета (рядов).	4.2. Не внесен один из реагентов – сыворотка, конъюгат или проявитель.	4.2.1. Переставить эти пробы. Внести, соответственно "Инструкции", необходимые реагенты.
5. Слабое окрашива- ние всего планшета. Значение ОП Конт- рольных образцов не отве-чают требо-	5.1. Уменьшено время инкубации.	5.1.1. Инкубацию проводить согласно "Инструкции".

ваниям инструк- ции к тест- набору		
	5.2. Срок пригодности тест- системы закончился	5.2.1. Проверить результаты на тест-системе с надлежащим сроком годности.



### Список литературы

1. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа - М.: Высш.шк., 1991. – 288 с.
2. Нго Г.Г., Ленкофф Г.М.(ред.) Иммуноферментный анализ. - М.: Мир, 1988. – 446 с.
3. Чумак Р.М. Імуноферментний аналіз і рекомбінантні антигени// Лабораторна діагностика. – 1999. - №3. – С. 3 – 6.
4. Ванеева Л.И., Гридчина И.Ю., Пантелеев О.А. и др. Изучение сорбционной способности полистироловых планшетов, используемых в ИФА.// ЖМЭИ. – 1986. – №9. – С. 44 – 48.
5. Esser P., Knudsen H., Nielsen V.et al. Solid Phase Guide. – Denmark:Nunc, 1999. – 50 p.
6. Раєвська Г.Є., Співак М.Я. Сучасні методи лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції // Мікроб.ж., 2000, т. 62, № 4, с.56-65.
7. Раєвська Г.Є., Співак М.Я., Пилипенко В.Г., Ростопіра Н.М., Ткачікова Л. Отримання пероксидазних кон'югатів для виявлення ВІЛ-специфічних антитіл методом імуноферментного аналізу// Імунологія та алергологія, 2002, № 2-3, с.39-42.
8. Самуилов В.Д. Иммуноферментный анализ // Соросовский образовательный ж. № 12, 1999, с. 9-15
9. Гончаренко В.С., Раєвська Г.Є., Кас'яненко Т.В., Ганова Л.А., Шимко Н.М. Порівняльне вивчення використання *o*-фенилендіаміну та тетраметилбензидину в імуноферментному аналізі для діагностики ВІЛ-інфекції, гепатитів В і С та сифілісу// Імунологія та алергологія, 2002, № 4, с.18-21.
10. Гирін В.М., Дзюблик І.В., Порохницький В.Г. та ін. Навчальний посібник з лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції /СНІДу. – Київ, 1999. – 160 с.

11. Інструкція з організації роботи лабораторій діагностики ВІЛ // Київ, 2002, № 71, 25 с.

12. Сергеева Т.А., Семенова Н.Н. Изучение диагностической ценности тест-системы “ИФА-ВІЛ 1/2” для выявления антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ)// Лаб.диагностика (Киев), 1997, № 2, с.34-39.

13. Масыго А.В. Некоторые ошибки при постановке ИФА, Кольцово, 2002, 31 с.

## Содержание

Сокращения, использованные в тексте пособия	
Вступление	
Иммуноферментный анализ	
Терминология	
Иммуноферментный анализ для обнаружения антител	
Иммуноферментный анализ для обнаружения антигенов	
Иммуносорбенты	
Твердофазные носители	
Иммобилизация антигенов или антител	
Конъюгаты, используемые в ИФА	
Субстраты и хромогены	
Типы иммуноферментных тест-систем	
Схема проведения ИФА на примере тест-системы "DIA-НСV"	
Схема проведения ИФА на примере тест-системы "DIA-НIV"	
Схема проведения ИФА на примере тест-системы для обнаружения HBs-антигена вируса гепатита В	
Схема проведения ИФА на примере тест-системы "DIA-Тохо-IgM для определения IgM против токсоплазм (IgM-ловушка)	
Оборудование, необходимое для работы с иммуноферментными тест-системами	
Требования и рекомендации при проведении исследований методом ИФА	
Качественная подготовка посуды	
Подготовка исследуемых образцов	
Соблюдение инструкции по применению тест-системы	

Соблюдение инструкции относительно состояния помещений помещений, где сохраняются тест-системы и проводятся исследования методами ИФА	
Соблюдение сроков и условий сохранения наборов	
Недопустимость смешивания компонентов из наборов разных серий	
Общин рекомендации, соблюдение которых способствует качественному проведению анализа	
Правила работы с автоматической пипеткой	
Соблюдение температурного режима и времени инкубации	
Отмывание планшета на каждом этапе проведения ИФА	
Правила работы с 3 конъюгатами и проявителями	
Периодический контроль работы оборудования	
Действия при неожиданных нарушениях рабочего режима	
Учт результатов ИФА	
Оценка диагностических характеристик иммуноферментной тест-системы	
Проблемы, которые могут возникнуть при проведении ИФА	
Список литературы	