



Первым заместителем Министра  
Д.Л. Пиневич

02. \_\_\_\_\_ 2012 г.

Регистрационный № 016-0272

**ВЫЯВЛЕНИЕ РАСТВОРИМОГО  
FAS/APO-1(CD-95)-АНТИГЕНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ  
КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО КРИТЕРИЯ ФОРМИРОВАНИЯ  
ГРУППЫ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ,  
НУЖДАЮЩИХСЯ В АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ**

Инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:**

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,  
ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,  
УО «Гомельский государственный медицинский университет»,  
УЗ «Гомельская областная клиническая инфекционная больница»

**АВТОРЫ:**

д-р мед. наук, проф. С. В. Жаворонок; Н. В. Москалёва; О. Л. Тумаш;  
канд. мед. наук О. А. Теслова; В. В. Кармазин

Минск 2012

Предлагаемая инструкция может быть использована для выявления группы ВИЧ-инфицированных пациентов, нуждающихся в начале антиретровирусной терапии (АРТ), с использованием в качестве дополнительного лабораторного критерия определение растворимого Fas/Apo-1 (CD-95)-антигена (sFas/Apo-1(CD-95)) в сыворотке крови.

### **Перечень необходимого оборудования**

*Оборудование, инвентарий:*

- 1) анализатор иммуноферментный (спектрофотометр вертикального сканирования);
- 2) центрифуга лабораторная;
- 3) ИФА-шейкер для планшетов;
- 4) термостат;
- 5) дозаторы пипеточные одноканальные автоматические для объемов 20–200 мкл, 100–1000 мкл;
- 6) дозатор пипеточный многоканальный автоматический для объемов 50–200 мкл;
- 7) сменные наконечники для дозаторов;
- 8) пробирки для забора и хранения крови.

*Реактивы:* иммуноферментный диагностический набор для качественного/количественного определения человеческого sFas/Apo-1(CD-95)-антигена в сыворотке крови.

### **Показания к применению**

Обследование и выделение группы ВИЧ-инфицированных пациентов, нуждающихся в назначении АРТ.

### **Противопоказания для применения**

Предлагаемый метод не имеет противопоказаний.

### **Описание технологии использования метода**

*Получение и подготовка биологического материала для исследования.* Взятие крови для исследования следует проводить из локтевой вены

пациента, утром, натощак, в сухие стерильные пробирки. Для получения сыворотки кровь центрифугировать при 1500 об/мин в течение 15 мин. Полученную сыворотку собирать в стерильные пробирки объёмом 1,5 мл и замораживать при температуре -20 °С. Заготовленные сыворотки размораживать однократно, непосредственно перед проведением исследования.

*Протокол твердофазного ИФА:*

- при использовании иммуноферментного диагностического набора для количественного определения человеческого sFas/Apo-1(CD-95)-антигена в сыворотке крови коммерческого производства проводить ИФА в строгом соответствии с инструкцией по применению набора;
- при использовании диагностической твердофазной иммуноферментной тест-системы на основе моноклональных антител (МКА) (клон ИКО-160) к sFas/Apo-1(CD-95)-антигену проводить ИФА в соответствии с методикой, описанной ниже.

Установить на рамку необходимое для проведения анализа количество сенсibilизированных стрипов. Приготовить раствор для отмывки разведением концентрата фосфатно-солевого буфера с твином 20 (ФСБ-Т). Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения. В лунки № 1 и № 2 первого стрипа внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца, в лунку № 3 — 100 мкл положительного контрольного образца. В оставшиеся лунки стрипов внести по 100 мкл сывороток крови пациентов. Стрип закрыть пленкой требуемого размера и инкубировать 60 мин во влажной камере при температуре 37 °С. Удалить образцы сывороток из лунок стрипов и 5-кратно промыть раствором ФСБ-Т. По окончании отмывки остатки промывочного раствора удалить из лунок, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге. Процедуру отмывки далее повторять после каждой стадии теста. После промывания в лунки планшета внести свежеприготовленный раствор конъюгата пероксидазы хрена с МКА к sFas/Apo-1(CD95)-антигену в рабочем разведении 1:800 в буфере для отмывки. Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники. Инкубировать 1 час во влажной камере при температуре 37 °С. Затем во все лунки внести по 100 мкл свежеприготовленного

рабочего раствора тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубировать в темноте 15 мин при комнатной температуре. Реакцию остановить добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-реагента. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр — 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–650 нм. Допускается измерение ОП на одной длине волны — 450 нм. Измерение проводить через 2–3 мин после остановки реакции. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 10 мин.

*Интерпретация результатов реакции:*

1. При использовании иммуноферментного диагностического набора для количественного определения человеческого sFas/Apo-1(CD-95)-антигена в сыворотке крови коммерческого производства интерпретировать результаты ИФА в соответствии с инструкцией по применению набора.

2. При использовании диагностической твердофазной иммуноферментной тест-системы на основе МКА (клон ИКО-160) к sFas/Apo-1(CD-95)-антигену интерпретировать результаты как описано ниже.

Рассчитать среднее арифметическое значение ОП (е.о.п.) в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОПср.К-) и с положительным контрольным образцом (ОПср.К+). Результаты анализа учитывать при соблюдении следующего условия: отношение  $ОПср.К+ / ОПср.К- \geq 5$ . Рассчитать критическое значение ОП (ОПкрит.) по формуле:  $ОПкрит. = ОПср.К- + 0,158$ . Если в результате анализа  $ОПобр. \geq ОПкрит.$ , то уровень sFas/Apo-1(CD95)-антигена повышен. Если в результате анализа  $ОПобр. < ОПкрит.$ , то уровень sFas/Apo-1(CD-95)-антигена низкий. Где ОПобр. — ОП в лунке с исследуемым образцом.

*Клиническая интерпретация результатов реакции.*

Наличие оппортунистических заболеваний, свидетельствующих об иммунодефиците (стадия ВИЧ-инфекции С по классификации центров контроля и профилактики заболеваний США — CDC, 1993 г.), вне зависимости от количества CD4-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных пациентов, является показанием к началу АРТ.

Если у пациента отсутствуют клинические симптомы иммунодефицита, для решения вопроса о назначении АРТ следует ориентироваться на количество CD4-лимфоцитов. Показанием к началу лечения является снижение числа CD4-лимфоцитов (менее 350 клеток в 1 мкл — уровень CD4-клеток, рекомендованный ВОЗ для старта антиретровирусной терапии).

Уровень sFas/Apo-1(CD-95)-антигена в сыворотке крови коррелирует с уровнем CD4+ Т-лимфоцитов ( $R = -0,52$ ,  $p < 0,001$ ). Уровень sFas/Apo-1(CD-95)-антигена в сыворотке крови выше порогового значения (значение порогового уровня sFas/Apo-1(CD-95)-антигена в сыворотке крови рассчитывается каждый раз при постановке ИФА по формуле (см. выше)) свидетельствует о наличии у ВИЧ-инфицированного пациента уровня CD4+ Т-лимфоцитов менее 350 клеток в 1 мкл (чувствительность (95%CI) = 68,2 (52,4–81,4) % и специфичность (95%CI) = 94,1 (71,2–99,0) %). Таким образом, при отсутствии возможности определения CD4+ Т-лимфоцитов определение уровня sFas/Apo-1(CD-95)-антигена в сыворотке крови является дополнительным лабораторным критерием для выделения группы ВИЧ-инфицированных пациентов, нуждающихся в АРТ.

### **Перечень возможных ошибок при выполнении ИФА и пути их устранения**

#### *1. Ошибки при подготовке пробы для анализа.*

Не следует использовать гемолизированные, гиперлипидные или повторно замороженные сыворотки крови. Не использовать сыворотки крови сразу после размораживания, без предварительного перемешивания. Свежие образцы сыворотки хранить при 2–8 °С не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре -20 °С (и ниже) не более 3 мес.

#### *2. Ошибка при подготовке необходимых реагентов для анализа.*

Следует строго соблюдать требования к хранению реагентов. Правильно разводить концентраты растворов, не нарушать соотношение при приготовлении рабочих смесей реагентов. Перед использованием необходимо убедиться, что растворы и реагенты гомогенны.

### *3. Ошибка при проведении ИФА.*

Не следует изменять протокол исследования. Регулярно проверять дозаторы и другое оборудование. В помещениях следует поддерживать постоянство температуры (18–25 °С) и влажности (80–85 %). Не следует допускать подсыхания лунок в период между инкубациями или промывками — возможно образование плохо растворимой пленки на их поверхности. В случае необходимости длительного перерыва следует положить планшет вверх доньшками лунок на смоченную водой марлю или фильтровальную бумагу. Желательно выделить отдельную посуду и наконечники для работы с раствором конъюгата. Контролировать равномерность заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Для работы с раствором ТМБ рекомендуется выделить отдельную посуду, которую нужно каждый раз ополаскивать 50%-ным раствором спирта и затем дистиллированной водой. Запрещается мыть посуду для ТМБ растворами синтетических моющих средств. Также желательно выделить отдельные наконечники для пипеток, которые будут применяться только для работы с раствором ТМБ. Сразу после использования рекомендуется промывать такие наконечники спиртом и дистиллированной водой.

### **Меры предосторожности**

Помещение для проведения исследований должно быть оснащено вытяжным шкафом. Все компоненты тест-системы являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Следует избегать его разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды. При работе с тест-системой следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы человеческой крови следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции. Следует надевать защитные очки, перчатки, резиновый фартук во время работы с кислотами и щелочами. Химическая посуда и оборудование должны быть маркированы с указанием хранящихся в них веществ и сроков их хранения. Для дезин-

фекции исследуемых образцов, посуды, материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА.

При выполнении работ необходимо соблюдать инструкции по технике безопасности при работе с лабораторным оборудованием.

Подписано в печать 04.04.12. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Zoom».

Печать ризографическая. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 0,46. Уч.-изд. л. 0,27. Тираж 50 экз. Заказ 213.

Издатель и полиграфическое исполнение:

учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».

ЛИ № 02330/0494330 от 16.03.2009.

ЛП № 02330/0150484 от 25.02.2009.

Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.