

**Институт средств медицинской диагностики
ЗАО «Вектор-Бест»**

А.В. Масяго

**НЕКОТОРЫЕ ОШИБКИ
ПРИ ПОСТАНОВКЕ ИФА**

Информационно-методическое пособие

Новосибирск
2001

ББК 28
М31

М31 Масаго А.В.

Некоторые ошибки при постановке ИФА. Информационно-методическое пособие. – г. Новосибирск: ЗАО «Вектор-Бест». 2001. – 36 с.

© ЗАО «Вектор-Бест», 2001

Многолетний опыт работы ЗАО «Вектор-Бест» по производству иммуноферментных тест-систем, постоянный контакт с широким кругом потребителей продукции, как из хорошо оснащенных диагностических центров, так и из лабораторий, имеющих минимально необходимое для постановки иммуноферментного анализа (ИФА) оборудование, дает нам возможность классифицировать и вскрыть причины некоторых ошибок, допускаемых при проведении иммуноферментного анализа. Автор не претендует на полноту освещения проблемы, однако надеется, что эта брошюра может быть полезна для наших читателей, использующих в своей работе ИФА.

Сотрудники ЗАО «Вектор-Бест» будут благодарны всем за любые замечания, предложения и описания случаев из личной практики, которые обязательно будут учтены при подготовке нового, более полного издания.

1. Помещение

Требования к помещениям изложены в ведомственных инструкциях. В реальной жизни руководителям достаточно трудно выполнить все предписания, поэтому зачастую для проведения ИФА используются приспособленные в той или иной степени помещения. Далее приведены некоторые факторы, которые могут повлиять на результат анализа.

Температура воздуха в лаборатории

Во многих тест-системах при проведении анализа по инструкции рекомендуется вести инкубацию планшетов при комнатной температуре. Под этим подразумевается температура 18–25°C. На практике температура в помещениях лабораторий варьирует от 12 до 30°C, что может привести к неправильным результатам тестирования. В некоторых лабораториях пытались уменьшить влияние температуры воздуха на результат реакции с помощью изменения времени инкубации, однако общих формул оценки влияния соотношения температуры и времени инкубации на оптическую плотность не существует. Поэтому единственным способом избежать этой ошибки является установка планшетов при выполнении этой операции в настроенный на комнатную температуру термостат (если температура ниже комнатной), либо прекращение работы (если температура выше).

Обычно в состав тест-системы входят концентраты растворов, которые перед постановкой необходимо развести дистиллированной водой. В инструкциях по применению часто не указывается, но подразумевается, что дистиллированная вода имеет комнатную температуру. При использовании слишком холодной дистиллированной воды, особенно в растворах, предназначенных для разведения сывороток и конъюгата, можно получить неправильный результат, независимо от температуры, при которой будет проводиться инкубация. Вероятность получения неправильного результата в этом случае выше, если продолжительность инкубации мала (например, 30 мин).

Относительная влажность воздуха

Как правило, влияние этого фактора менее существенно. Однако, если используются длительные времена инкубации при комнатной температуре, то при сухом воздухе (обычно относительная влажность воздуха в помещениях ниже в зимний период) лучше использовать влажную камеру. В противном случае происходит подсыхание раствора с образованием «ободка» на боковой поверхности лунки планшета, который при промывке может сохраниться и повлиять на результат анализа на следующих его стадиях. Следует заметить, что если используется настроенный на комнатную температуру термостат при низкой температуре воздуха в лаборатории, то относительная влажность в термостате обычно намного ниже относительной влажности в помещении.

Недостаточная вентиляция

Душный воздух в лаборатории приводит к быстрой утомляемости лаборанта, и, как следствие, к увеличению числа ошибок (неправильный отбор проб пипеткой, занос пробы в другую лунку и т.д.). Следует отметить, что в большинстве тест-систем в инструкциях указано на необходимость применения масок либо респираторов, что и без плохой вентиляции затрудняет дыхание.

Общая загроможденность

Для постановки анализа необходимо достаточное количество площади лабораторного стола. В противном случае возрастает вероятность пролива растворов, они могут быть перепутаны и т.п.

2. Оборудование и расходные материалы

Проверка автоматической пипетки

В инструкциях по применению большинства тест-систем указано, что погрешность пипеток не должна превышать 5%. Неправильное дозирование растворов на любой стадии анализа может привести как к росту, так и к снижению оптической плотности, замеряемой при оценке результата анализа.

Наиболее простой способ проверки пипетки – взвешивание дистиллированной воды, дозируемой пипеткой. Вес 1 мкл дистиллированной воды при комнатной температуре с большой точностью равен 1 мг. Таким образом, настроив пипетку на дозу 100 мкл, мы должны получить вес воды около 100 мг. Желательно сделать несколько повторов для того, чтобы убедиться в воспроизводимости результатов. Весы, позволяющие измерять вес от 10 до 200 мг с необходимой точностью, достаточно доступны и просты в обращении.

Не стоит пытаться проверять точность дозирования многократным повтором с последующим измерением суммарного объема с помощью мерного цилиндра. Такой способ не позволяет обнаружить пипетку, которая дозирует правильный средний объем при сильном разбросе между последовательными дозами. (Например, пипетка настраивается на дозирование 100 мкл, производится 20 дозирований, с помощью мерного цилиндра измеряется объем, который должен составить около 2 мл. Пипетка дозирует случайным образом от 85 до 115 мкл, что, при большом количестве дозирований, приводит к ожидаемому объему.)

Промыватели планшетов

Наиболее характерным источником погрешностей является засорение каналов промывателей. Недостаточная промывка приводит обычно к завышению сигнала. Обнаружить это достаточно просто – при использовании рядного промывателя повышенный сигнал имеет один из рядов, при использовании 96-канального – одна и та же лунка разных планшетов. Необходимо отличать такую неисправность от неисправности многоканального спектрофотометра.

Менее часто встречается засорение пространства между иглами промывателя (труднее визуально это обнаружить у автоматических промывателей) кусочками марли или ваты. Такое засорение приводит к заносу растворов из одной лунки в другие, оптическая плотность в соседних по ряду от сильноположительно-го образца лунках повышена, при этом оптическая плотность тем меньше, чем далее расположена лунка от положительного образца (как при титровании).

Как ручные, так и автоматические промыватели в конце рабочего дня следует тщательно промывать дистиллированной водой для предотвращения проростов в шлангах.

Посуда

Посуда должна быть чистой. Необходимо выделить отдельную посуду для приготовления и манипуляций с растворами конъюгата, ТМБ и ОФД. Посуду для растворов ТМБ, ОФД и конъюгата необходимо мыть более тщательно, так как влияние возможных загрязнений на эти растворы сильнее отражается на результате анализа. Особенности мытья посуды и манипуляций с раствором ОФД изложены в инструкциях по применению тест-систем.

Предлагаемая методика подготовки одноразовых наконечников к повторному использованию дана в приложении.

Термостаты

В целом, благодаря отсутствию подвижных деталей, термостаты редко выходят из строя. Однако желательно периодически проверять температуру с помощью дополнительного контрольного термометра. В некоторых термостатах неудачной конструкции может наблюдаться высокая разность температур между нижней и верхней полками.

Следует учитывать, что при низкой относительной влажности в лаборатории (зимний период) или при низкой температуре в помещении относительная влажность в термостате может стать настолько малой, что даже при небольших временах инкубации возможно подсыхание растворов в лунках. В таких случаях лучше использовать влажную камеру или клеивать планшет липкой пленкой.

Спектрофотометры

Многоканальные спектрофотометры являются самыми сложными из необходимых для постановки иммуноферментного анализа приборов.

Спектрофотометры различных фирм могут сильно отличаться конструктивно, поэтому невозможно в рамках данной брошюры указать на все возможные нарушения правил эксплуатации этих приборов. Можно только отметить наиболее распространенные ошибки и неисправности.

Во-первых, следует совместно со специалистами правильно подключить прибор. Часто требования к колебаниям напряжения в сети очень жесткие (обычно они указаны в инструкции к прибору), специалисты на местах знают типичные колебания напряжения и могут посоветовать те или иные меры противодействия.

Во-вторых, обычно спектрофотометры требуют длительного времени прогрева, что указано в инструкции по эксплуатации. Нарушение данного требования может привести к неправильному измерению оптической плотности. Поэтому, если ожидается измерение оптической плотности примерно через 30 минут после очередного измерения, прибор лучше оставить включенным. В большинстве спектрофотометров наименьшим ресурсом обладает источник света – мощная лампа, во многих инструкциях указан пересчет влияния каждого включения на ресурс лампы (например, 1 включение равносильно 40 минутам работы лампы).

Спектрофотометры обычно имеют допустимую погрешность измерения до 10%. Проверить это можно, например, промеряя дважды подряд один и тот же планшет сразу после постановки ИФА и вычисляя различие в величине оптической плотности в одинаковых лунках. При этом желательно развернуть планшет так, чтобы лунка А1 заняла место лунки Н12. Следует учитывать, что при оптической плотности выше 1,5 о.е. погрешность спектрофотометра может возрасти ввиду конструктивных особенностей прибора.

Марля или фильтровальная бумага

В практике приходилось сталкиваться с такими случаями. При удалении мелких капель из планшета (простукивание) использовалась марля. Ввиду перебоев в снабжении марля использовалась многократно, периодически обрабатывалась раствором хлорамина. После одной из обработок марля не была достаточно

промыта от остатков хлорамина, что привело к попаданию хлорамина в лунки планшетов при простукивании. В результате в случайном наборе лунок наблюдалось повышение сигнала до 0,8 о.е., даже в контроле конъюгата. После смены марли «выбрось» по оптической плотности исчезли.

Фильтровальную бумагу для простукивания желательно использовать однократно.

Дистиллированная вода

Формальные требования к качеству дистиллированной воды приведены в соответствующем ГОСТе (основные показатели: масса сухого остатка после выпаривания – не более 5 мг/л, рН – 5,4–6,6, удельная проводимость при 20°C – не более 0,0005 См/м). В практике приходилось сталкиваться с влиянием качества воды на результат реакции во многих лабораториях.

Влияние качества дистиллированной воды на результат реакции чаще наблюдается весной и осенью, что, по-видимому, связано с ухудшением качества водопроводной воды.

Правильная эксплуатация и своевременная профилактика дистилляторов не является достаточным условием.

При долгом хранении дистиллированной воды возможен бактериальный пророст. Желательно не хранить дистиллированную воду более 2–3 дней. Не следует добавлять в дистиллированную воду в качестве консерванта азид натрия, так как он является ингибитором пероксидазы и может повлиять на активность конъюгата при разведении. Если дистиллированная вода хранилась в холодильнике, то перед приготовлением растворов для ИФА ее следует прогреть до комнатной температуры, в противном случае возможно понижение оптической плотности.

Планшет для предварительного разведения сывороток

Если используется планшет для предварительного разведения сывороток, то следует использовать этот планшет однократно.

Нельзя применять для предварительного разведения неиспользованные планшеты из наборов с сорбированными антигенами или антителами.

3. Подготовка образцов

Данная глава несколько выходит за рамки настоящей брошюры, однако неправильное приготовление образцов может существенно повлиять на все последующие результаты анализа.

Рекомендуемое приготовление сыворотки: отстаивание 0,5–1 час при 37°C в термостате для быстрого формирования фибринового сгустка (не превратившийся в фибрин фибриноген является источником ложнопозитивных реакций во многих тест-системах), центрифугирование 10 минут при 3 000 об/мин или 20 мин при 1 500 об/мин.

При приготовлении сывороток должны быть приняты все меры, позволяющие исключить контаминацию.

Случай из практики: на одной из СПК количество ложноположительных результатов было намного выше обычного уровня, при поиске причин удалось выяснить, что при заборе проб использовалась стеклянная пипетка, которая ополаскивалась перед забором следующей пробы физраствором, в случае попадания в исследуемые за день пробы высокотитражного образца количество ложноположительных реакций резко возросло.

Более сложны для расследования случаи ошибочной маркировки проб или сознательной их подмены.

4. Инструкция по применению

При получении новой серии наборов даже хорошо Вам знакомой тест-системы следует прочитать инструкцию. Прогресс в иммуноферментном анализе в настоящее время сравним с прогрессом в вычислительной технике. В связи с этим, практически все тест-системы совершенствуются, что может отразиться на методиках подготовки реактивов и протоколе реакции.

В случае возможных разночтений в инструкции лучше позволить производителям и разрешить возникший вопрос – не следует экспериментировать самим.

Наиболее распространенное сознательное нарушение инструкции при постановке анализа – сокращение времени инкубации раствора ОФД, осуществляемое в целях уменьшения количества ложноположительных результатов. При этом причина возникновения завышенного количества ложноположительных результатов (заводской брак, неправильная транспортировка, неправильное хранение, неверная постановка анализа) не выясняется и не устраняется. Такие изменения протокола ИФА могут существенно снизить выявляемость слабopоложительных образцов, т.е. привести к ложноотрицательным результатам.

Многие требования к хранению реагентов, подготовке и проведению реакции подразумеваются, но иногда не указаны в инструкции. Ниже приведены некоторые из таких требований (за основу взята инструкция по применению тест-системы Ortho HCV v3.0).

Подготовка

1. Если в тест-системе используются компоненты, полученные из крови человека, то к таким компонентам следует относиться как к потенциально инфекционным независимо от результатов тестов, которые провел производитель тест-системы.

2. При работе с компонентами набора и исследуемыми образцами работать только в перчатках. По окончании работы обязательно тщательно вымыть руки.

3. Все исследуемые образцы следует считать потенциально инфекционными.

4. При работе с таблетками ОФД следует использовать только пластиковые пинцеты или пинцеты с пластиковым покрытием, так как ОФД может реагировать с металлами, что может привести к неправильным результатам.

5. Попадание ОФД в глаза, на кожу или одежду может привести к раздражению или аллергической реакции. В случае попадания ОФД на кожу следует промыть место контакта большим количеством воды.

6. ОФД является свето- и влагочувствительным. Флакон с ОФД следует хранить плотно закрытым. Перед тем, как открыть флакон с ОФД следует довести его до комнатной температуры во избежание конденсации влаги внутри флакона. Не следует использовать сломанные таблетки ОФД.

7. Для приготовления реагентов следует использовать дистиллированную или деионизированную воду. Эту воду следует хранить в неметаллических емкостях.

8. Не следует использовать реагенты из разных серий тест-системы.

9. Все реагенты и компоненты тест-системы должны быть доведены перед использованием до комнатной температуры, а после работы должны храниться при температуре от 2 до 8°C. При дробном использовании набора следует сократить до минимума нахождение растворов при комнатной температуре и особенно в открытой посуде.

10. Если производитель использует осушитель, меняющий цвет при насыщении влагой (наиболее распространена смена цвета с синего на розовый), запрещается использовать планшет в случае достижения осушителем «неправильного» цвета.

11. Не следует использовать реагенты позднее указанного срока годности.

12. Следует предпринять все меры для предотвращения возможного перепутывания или перемешивания реагентов (например, использовать только специально предназначенные и подписанные емкости для приготовления реагентов).

13. Перед использованием убедитесь, что растворы и реагенты гомогенны.

14. Планшеты (стрипы) можно использовать для постановки ИФА только один раз.

15. Перед вскрытием пакета с планшетом его следует выдерживать при комнатной температуре примерно 30 минут для предотвращения конденсации влаги на планшете. Если планшет разборный, и используются не все стрипы сразу, то после вскрытия оставшиеся стрипы следует поместить в пакет, который необходимо закрыть. Распространенный способ – край пакета сворачивается вдвое и зажимается скрепками. Зарубежные фирмы вкладывают в наборы специальные зажимы для этих целей, эти зажимы можно использовать и для укупок пакетов с планшетами отечественных производителей. Не следует удалять пакетик с влагопоглотителем.

Постановка реакции

16. Следует убедиться в том, что исследуемый образец или реагент внесен в лунку.

17. При использовании одноканальной пипетки для внесения испытуемых образцов необходимо использовать новый наконечник для каждого образца. При использовании многоканальной пипетки следует использовать новые наконечники для каждого используемого реагента.

18. Реакция связывания антител с антигенами начинается сразу после внесения сыворотки в лунку, поэтому желательно, по возможности, уменьшить период между внесением первой и последней сывороток на планшет. В случае длительного времени внесения образцов (например, постановка цельного планшета) рекомендуется перестановка сывороток, дающих оптическую плотность в ближайшем к серой зоне районе оптических плотностей.

19. Если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов (например, 2 сыворотки внесены в одну лунку), нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец. Такая лунка бракуется.

20. 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, в норме – не допускать длительного перерыва.

21. Не следует касаться дна лунок – отпечатки пальцев или перчаток могут привести к неправильной регистрации оптической плотности.

22. При использовании стрипов следует работать с обязательной фиксацией стрипов в рамке. Следует осторожно протереть донышки лунок с помощью мягкой, не оставляющей волокон салфетки (при наличии на донышках капель влаги, пылинок и других загрязнений) до регистрации оптической плотности.

23. В случае получения оптической плотности от контрольных образцов, не попадающей в интервал, описанный в соответствующем разделе инструкции, следует считать, что имеются ошибки при подготовке или постановке реакции, либо тест-система непригодна к применению.

24. Если используется ридер без калибровочного фильтра на 620–630 нм, следует учитывать возможность того, что мутные или загрязненные области планшета могут быть зарегистрированы с завышенным значением реальной оптической плотности.

25. Если производитель не упоминает в инструкции об использовании калибровочного фильтра, то следует учитывать возможность сдвига $OP_{\text{крит}}$ при некоторых формулах расчета в случае вычета оптической плотности на длине волны калибровочного фильтра (например, если при формуле $OP_{\text{крит}} = OPK^- + 0,2$ вычет оптической плотности на длине волны калибровочного фильтра практически не влияет на интерпретацию результатов, так как при незагрязненных донышках от всех значений оптической плотности исследуемых образцов и K^- отнимается примерно одно и то же число и разница между оптикой K^- и исследуемым образцом практически не изменяется, то при формуле $OP_{\text{крит}} = OPK^- \times 3$ при малых значениях OPK^- можно достаточно далеко отойти от результата, планируемого производителем, так как от исследуемого образца оптическая плотность на длине волны калибровочного фильтра отнимается один раз, а от $OP_{\text{крит}}$ отнимается фактически 3 раза).

26. Необходимо сличать полученную распечатку оптической плотности лунок с визуальной оценкой. Возможны искажения реальной оптической плотности в результате попаданий соринки в лунку или загрязнений донышка лунки.

Особенности работы с конъюгатом

Необходимо выделить отдельную посуду и наконечники для работы с раствором конъюгата. Идеальный вариант – использование посуды и наконечников однократного применения. В реальной жизни часто не имеется такой возможности. Если посуда и нако-

нечники используются многократно, то при подборе схемы мойки должно быть учтено сильное влияние даже **следовых** количеств таких веществ, как перекись водорода, хлорамин, азид натрия или дольки в синтетические моющие средства, на активность конъюгата.

Рабочий раствор конъюгата желательнее готовить непосредственно перед применением.

Промывки

Равномерность заполнения и опорожнения всех лунок планшета контролируют, как правило, визуально в процессе промывки.

В идеале – перед промывкой содержимое лунок отсасывается пипеткой или вошером, затем при промывке лунки заполняются до самого верха. При таком способе промывки резко падает вероятность появления неправильных результатов, связанных с загрязнением боковых поверхностей лунок растворами сывороток или конъюгата.

Особенно тщательно следует промывать планшет после инкубации конъюгата.

***Случай из практики.** В одной из лабораторий при работе с тест-системой «РекомбиБест антипаллидум» был слишком высок процент ложноположительных реакций. Выяснилось, что после инкубации конъюгата содержимое лунок удаляли стряхиванием планшета, затем проводили промывку, используя ручной вошер, заполняя лунки до уровня не более 200 мкл. При инкубации раствора ОФД в некоторых лунках наблюдалось окрашивание раствора при стекании небольших капель с боковых поверхностей. Окрашивание наблюдалось в месте контакта капель с раствором. Переход на отсасывание растворов после инкубации вместо стряхивания и увеличение объема промывки до 300 мкл позволил избавиться от таких ложноположительных результатов.*

Разведение сывороток

Следует учитывать, что сыворотки и типичные разводящие растворы для сывороток могут различаться по плотности и вязкости. Поэтому при приготовлении разведений их следует тщательно перемешать пипетированием.

***Случай из практики.** При работе с тест-системой использовалось рабочее разведение сыворотки 1:400. Для получения предварительного разведения 1:20 использовался вспомогательный*

планшет, в котором 10 мкл сыворотки разводили в 190 мкл раствора, далее 10 мкл сыворотки в предварительном разведении переносили в лунки планшета со 190 мкл раствора. Результаты ИФА у двух лаборантов отличались по некоторым сывороткам почти в 5 раз. Выяснилось, что один из лаборантов не перемешивал сыворотки в лунках вспомогательного планшета. Сыворотка аккуратно добавлялась в раствор, после чего, через некоторое время, также аккуратно отбиралась из того же угла лунки, в который была внесена.

Раствор ОФД

Основные требования к подготовке раствора ОФД обычно изложены в инструкциях по применению.

Для работы с раствором ОФД рекомендуется выделить отдельную посуду, которую нужно каждый раз ополаскивать 50%-ным раствором спирта и затем дистиллированной водой. Запрещается мыть посуду для ОФД растворами синтетических моющих средств.

Также желательно выделить отдельные наконечники для пипеток, которые будут применяться только для работы с раствором ОФД. Сразу после использования рекомендуется промывать такие наконечники спиртом и дистиллированной водой.

Раствор ТМБ

В основном требования к работе с ТМБ такие же, как и при работе с ОФД, в той части, которая касается светочувствительности, использования отдельной посуды и ее подготовки, использования отдельных наконечников для дозирования растворов ТМБ в ЦФР. Кроме этого, следует соблюдать следующие правила:

1. Отбор концентрата ТМБ проводить только *новыми* наконечниками.

2. Не использовать посуду и наконечники для отбора раствора ТМБ в ЦФР, если они ранее применялись для растворов ОФД, так как даже следовые количества ОФД приводят к неправильным результатам.

3. Составы ЦФР для ТМБ и ОФД различны, поэтому нельзя использовать для разведения ТМБ ЦФР из наборов с комплектацией таблетками ОФД и наоборот.

4. В тест-системах с комплектацией ТМБ нельзя использовать комплект ЦФР-ОФД из других наборов, это может привести

к неправильным результатам, поскольку все компоненты набора подобраны для системы ТМБ-ЦФР.

5. В тест-системах с ОФД и ТМБ обычно используются стоп-реагенты, отличающиеся количеством серной кислоты, поэтому нельзя использовать стоп-реагент из тест-системы с комплектацией ОФД для работы с тест-системой, укомплектованной ТМБ.

6. Следует учитывать, что система ТМБ-ЦФР обеспечивает примерно в 10 раз более высокую чувствительность выявления пероксидазы, чем система ОФД-ЦФР, поэтому необходима более тщательная и аккуратная работа во избежание попадания в лунки капель растворов, содержащих входящую в состав конъюгатов пероксидазу, с рабочих поверхностей оборудования, перчаток и спецодежды. Признаком такого нарушения правил работы является спорадическое появление на планшете лунок с более высокой оптической плотностью.

***Пример из практики.** При постановке тест-системы, укомплектованной ТМБ, много ложноположительных результатов, при перестановке – то же, воспроизводимость отсутствует. При более тщательной обработке рабочих поверхностей и перчаток водно-спиртовым раствором, эффект появления невоспроизводимых ложноположительных результатов исчез.*

Учет результатов

Следует учитывать, что реакция окисления ОФД при добавлении серной кислоты до конца не останавливается. Поэтому нежелательно измерять оптическую плотность лунок позже, чем через 30 минут после добавления серной кислоты в качестве стоп-реагента.

Если в инструкции по применению не введено понятие «серой зоны», то желательно учитывать возможное влияние ошибок дозирования пипеткой (5%) и измерения оптической плотности спектрофотометром (10%). Таким образом, сыворотки, оптическая плотность которых после постановки ИФА отличается не более, чем на 15% от $ОП_{крит}$, следует признавать сомнительными.

5. Действия во внестатной ситуации

Отказ спектрофотометра

Возможная ситуация: необходимо измерить оптическую плотность, спектрофотометр не работает, отремонтируют его только завтра. Если оставить планшет до следующего дня, то произойдет повышение оптической плотности во всех лунках, так как даже при добавлении серной кислоты в раствор ОФД цветная реакция не останавливается полностью.

Возможным выходом может стать быстрое замораживание планшета после добавления серной кислоты с последующим быстрым оттаиванием перед измерением оптической плотности. Следует учитывать при этом, что оптическая плотность все-таки возрастает, а относительный прирост сигнала более высок для небольших значений оптической плотности.

На рисунках 1 и 2 приведены графики зависимости относительного роста величины оптической плотности от начальной оптической плотности для планшета, помещенного на ночь в морозильную камеру бытового холодильника, и для планшета, оставленного в темноте на ночь при комнатной температуре.

Отказ термостата

Если обнаружено, что термостат не обеспечивает необходимой температуры, то наилучшим выходом следует признать приостановление работы.

Распространенная ошибка при отказе термостата – постановка ИФА при пониженной температуре, но с увеличением времени инкубации.

К сожалению, различные тест-системы по-разному реагируют на изменение температуры и времени инкубации, поэтому универсальных рецептов работы при неисправном термостате нет.

Отсутствие места в холодильнике

В случае, если отсутствует возможность размещения наборов при хранении в холодильнике, следует обеспечить хранение

хотя бы основных компонентов: планшетов, конъюгата, концентратов растворов для разведения сывороток и конъюгата, контрольных образцов. Буферные растворы (ФСБТ, ЦФР) и таблетки ОФД обычно менее чувствительны к изменению температуры хранения.

Следует учитывать, что серии компонентов подобраны таким образом, что нежелательно использовать, например, конъюгат серии X из наборов серии А, вместо конъюгата серии Y при постановке наборов того же наименования, но серии В. Поэтому необходимо принять меры, предотвращающие возможное изменение комплектации наборов.

Рисунок 1

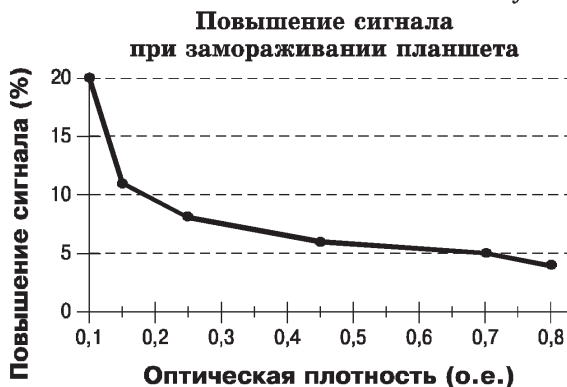
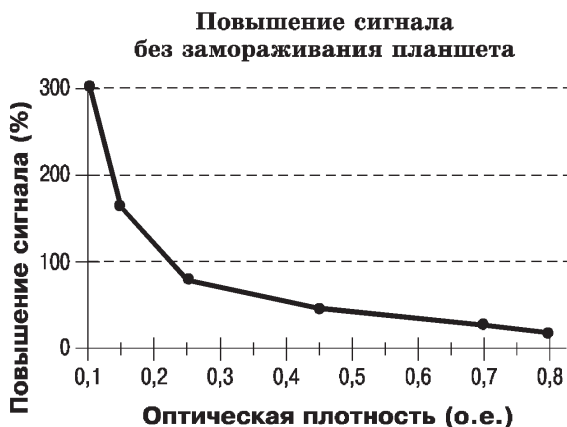


Рисунок 2



6. Внешний и внутренний контроли

Все возможные ошибки постановки и неисправности оборудования перечислить невозможно. Однако можно проверить себя, после чего либо искать причину неправильного результата, либо с некоторой степенью уверенности утверждать, что все сделано правильно.

Паспорт производителя

К каждой серии наборов производитель прикладывает паспорт, в котором отражены, в том числе, значения ОП К⁺ и ОП К⁻. В случае, если получены результаты, сильно отличающиеся от паспортных, следует проверить еще раз правильность постановки ИФА и, исключив возможность ошибки в проведении анализа и интерпретации полученных результатов, обратиться к производителю тест-систем.

Панели и стандарты

Внутренние контроли (ОП К⁺ и ОП К⁻) далеко не всегда в достаточной мере отражают чувствительность и специфичность тест-системы. Более полную информацию можно получить при использовании панелей сывороток или стандартных образцов. В настоящее время в России доступны панели сывороток, содержащих и не содержащих антитела к ВИЧ и гепатиту С, панель сывороток, содержащих иммуноглобулины класса М к вирусу гепатита А, а также стандартный образец HbS-антигена. В ближайшее время ожидается появление панели сывороток, содержащих различные количества HbS-антигена. Все серии вышеперечисленных панелей и стандартного образца при выпуске аттестуются Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля медицинских иммунобиологических препаратов (ГИСК) им. Л.А. Тарасевича.

Если в лаборатории нет возможности приобрести панели ГИСК, либо по «нужной» инфекции панели отсутствуют, то желательно иметь хотя бы небольшие внутрилабораторные контроли (6–8 сывороток, проверенных ранее, которые расфасовывают в микропробирки и хранят в замороженном виде). Следует учитывать, что при хранении и многократных замораживаниях-оттаиваниях возможно падение специфической активности.

7. Сравнение с результатами других диагностических методов

Любой диагностический метод имеет свои ограничения. Современный уровень науки и техники пока не позволяет создать диагностические методы, обладающие 100-процентными чувствительностью и специфичностью. Поэтому не следует сразу отвергать результаты ИФА, если они противоречат результатам, полученным другими методами. Точно также не следует сразу отвергать результаты других методов в том случае, если они противоречат ИФА. Более того, совместное использование различных диагностических методов позволяет с большей вероятностью ставить правильный диагноз, либо оценивать вероятность правильности поставленного диагноза (см. раздел «Прогнозируемые значения»).

В целом существует уже сложившийся опыт применения стандартных методов диагностики, поэтому ошибки при интерпретации результатов встречаются относительно редко. Из новых методов наиболее быстро развивается метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Отношение к ПЦР на нынешнем этапе не критичное, многими врачами этот метод воспринимается как «золотой стандарт», поэтому при расхождении результатов с ИФА результаты ПЦР принимаются чаще как более верные. По оценкам западных специалистов этот период сменится периодом недоверия и необъективной критики метода ПЦР и лишь через 5–10 лет отношение к нему станет объективным.

Приложение

Чувствительность и специфичность

Применяя тот или иной метод диагностики, лечащий врач часто хотел бы знать – с какой вероятностью можно доверять методу. Самый лучший метод, с точки зрения лечащего врача, должен иметь стопроцентную надежность, хотя по абсолютному большинству заболеваний нынешний уровень науки и техники пока не позволяет создать такие методы.

Для того, чтобы формализовать практическую ценность различных методов диагностики, были введены понятия чувствительности, специфичности, прогнозируемого значения. Эти понятия применимы для любого качественного, т.е. отличного от количественного, метода диагностики заболеваний, однако широкое применение нашли только в лабораторной диагностике.

Чувствительность – доля больных (инфицированных), которые признаны больными (инфицированными) в результате применения метода диагностики, от общего количества больных (инфицированных), проверенных с помощью данного метода диагностики.

Специфичность – доля здоровых, которые признаны здоровыми в результате применения метода диагностики, от общего количества здоровых, проверенных с помощью данного метода диагностики.

В идеале, для того, чтобы определить чувствительность и специфичность метода диагностики, необходимо с его помощью проверить все население Земли; при этом надо заранее знать, кто из жителей является здоровым, а кто больным. Именно тогда и только тогда чувствительность и специфичность равны вероятности того, что метод диагностики дал правильный результат.

Так как на практике такое измерение провести невозможно, используются методы оценки чувствительности и специфичности с помощью наборов (панелей) образцов исследуемых материалов, которые обычно достаточно хорошо проверены различными другими методами и, зачастую, дополнены сведениями из истории болезни.

Чем более правильно подобраны образцы панели, тем ближе результаты проверки метода диагностики на ней совпадут с идеаль-

ным случаем. В настоящее время все проблемы составления панелей не решены, что приводит к многочисленным ошибкам и дискуссиям. Коротко можно назвать некоторые из серьезных проблем: региональные различия; представительство образцов от больных несколькими болезнями; представительство образцов от больных другими заболеваниями, но не болеющих именно тем заболеванием, для диагностики которого предназначен метод; временной дрейф.

Обычно достаточно трудно оценить все вероятности, поэтому на практике часто просто сравнивают по чувствительности и специфичности две-три тест-системы разных производителей с целью выбора лучшей.

Как правильно сравнить две тест-системы?

Для того, чтобы сравнить две тест-системы по чувствительности и специфичности, надо взять панель (назовем ее панель А) и одновременно, «руками» одного лаборанта, поставить анализ в обеих тест-системах. Если это возможно, то хорошо бы повторить сравнение в другой день «руками» другого лаборанта. Затем все это повторить с использованием панели В, произведенной другим производителем. Возможные варианты полученных результатов приведены в таблице 1.

Таблица 1

№ варианта	Тест-система	Панель	Чувствительность	Специфичность
1	1	А	98	96
		В	96	96
	2	А	94	95
		В	92	96
2	1	А	98	96
		В	94	92
	2	А	93	91
		В	95	96
3	1	А	98	92
		В	95	91
	2	А	82	98
		В	85	98
4	1	А	98	92
		В	95	91
	2	А	94	96
		В	90	96

В варианте 1 следует выбрать тест-систему 1 (ее чувствительность и специфичность выше).

В варианте 2 необходима проверка на дополнительных панелях (чувствительность и специфичность 1 тест-системы выше при проверке с помощью панели А, но ниже при проверке с помощью панели В).

В варианте 3 следует выбрать тест-систему 1 (чувствительность тест-системы 1 выше при проверке на обеих панелях, специфичность ниже; но при этом разница в чувствительности намного превышает разницу в специфичности).

В варианте 4 выбор затруднен. Обычно в таких случаях учитывают другие факторы (особенности инфекции, воспроизводимость и т.д.).

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

Пример 1. С помощью тест-системы С проверяется большой контингент пациентов, некоторые из них признаются положительными. Положительные в тест-системе С образцы исследуются с помощью тест-системы D, затем положительные в тест-системе С образцы передаются на подтверждение более надежным методом E, и составляется примерно такая таблица:

Таблица 2

Тест-система	Количество образцов, признанных отрицательными	Количество образцов, признанных положительными	Подтверждено положительных методом E
С	960	40	30
D	10	30	30

На основании данных таблицы делается вывод о том, что специфичность тест-системы С составляет 75% ($30/40 \times 100\%$), а специфичность тест-системы D составляет 100% ($30/30 \times 100\%$), а, следовательно, тест-система D лучше тест-системы С.

Такого вида выводы можно встретить в докладах на многих конференциях и даже иногда в публикациях в научных журналах.

Как более правильно обработать результаты таблицы? Можно сделать только некоторые оценки. Если заболевание достаточно мало распространено, и образцы отбирались от случайных паци-

ентов (не в группе риска), можно предположить, что из 1000 пациентов не менее 950 – здоровы. Тогда из 950 здоровых тест-система С признала здоровыми 940 пациентов (10 ошибочно признаны больными, так как не подтверждены методом Е); таким образом, специфичность тест-системы С не менее 98% ($940/950 \times 100\%$). Что можно сказать о тест-системе D? Из приведенных данных можно оценить чувствительность. Тест-система D признала больными 30 пациентов, которые признаны больными тест-системами С и Е, таким образом чувствительность тест-системы D близка к 100%. Если бы с помощью тест-системы D были проверены все 1 000 пациентов, тогда можно было бы сравнить специфичности обеих тест-систем. Еще более точные расчеты можно было бы провести, если бы все пациенты были проверены с помощью метода Е.

Поэтому на основании таблицы можно сделать примерно такой вывод:

«Тест-система С имеет специфичность более 98%, тест-система D имеет чувствительность около 100%. При этом надо учитывать, что специфичность тест-системы С оценена более точно (на 1000 образцах), чем чувствительность тест-системы D (оценена на 30 образцах). Полученные данные не позволяют сравнить качество тест-систем».

Пример 2. Лаборатория проверяет с помощью панели А чувствительность и специфичность тест-системы В. Затем другая лаборатория проверяет с помощью той же панели А чувствительность и специфичность тест-системы С. Можно ли сравнивать на основании полученных данных тест-системы В и С? Чаще всего – нельзя, так как лаборатории могут сильно отличаться как по оборудованию, так и по квалификации персонала.

Пример 3. С помощью тест-систем А и В проверяется достаточно большой контингент пациентов. По результатам составляется таблица примерно следующего вида:

Таблица 3

Тест-система	Количество образцов, признанных отрицательными	Количество образцов, признанных положительными	Процент признанных положительными
А	980	20	2
В	970	30	3

На основании данных таблицы делается вывод о том, что тест-система В имеет более высокую чувствительность, чем тест-система А, а тест-система А имеет более высокую специфичность.

По данным этой таблицы *ничего нельзя сказать ни о чувствительности обеих тест-систем, ни о специфичности, так как неизвестно, кто из пациентов болен (инфицирован), а кто здоров.* Вполне возможна ситуация, при которой все 20 образцов, признанных положительными в тест-системе А, действительно принадлежат больным, которых всего 20 (чувствительность А = 100%). А из 30 образцов, признанных положительными в тест-системе В, только 10 взяты от больных, которых всего 20 (чувствительность В = 50%).

Пример 4. Тест-система А при проверке на 2-3 положительных сыворотках дает более высокий сигнал, чем тест-система В. Обе тест-системы проявляют сыворотки как положительные. Делается вывод о том, что *тест-система А более чувствительна, чем тест-система В.*

Данный вывод слабо обоснован – вполне возможно, что на большей выборке аттестованных положительных сывороток тест-система В может проявить правильно равное или большее количество сывороток, чем тест-система А.

Пример 5. С помощью тест-системы А исследуются сыворотки 220 трупов на наличие антител к ВИЧ с целью проверки пригодности тест-системы для ВИЧ-контроля донорского трупного материала. Два образца проявили себя как положительные, остальные – как отрицательные. Положительные образцы при проверке методом вестерн-блоттинга проявили себя как отрицательные. На основании проведенной работы утверждается, что *тест-система А может быть использована для определения антител к ВИЧ в донорской трупной крови.* (Материалы VII съезда ВОЭМП).

Так как ВИЧ-инфекция слабо распространена в России, можно применить рассуждения, приведенные в примере 1, то есть оценить специфичность ($218/220 \times 100\% = 99\%$). *Для правильной проверки тест-системы А необходимо дополнить работу исследованиями образцов, полученных из крови трупов ВИЧ-инфицированных. Только тогда можно утверждать о пригодности или непригодности тест-системы для работы с донорской трупной кровью.*

Прогнозируемые значения

«Производители утверждают, что специфичность их тест-системы 96%, но у меня только треть положительных образцов подтверждается референс-методом, остальные признаются ложнопозитивами – что-то здесь не так».

Действительно, происходит подмена понятий – специфичности и положительного прогнозируемого значения.

При использовании качественных, т.е. не количественных, методов диагностики в клинической практике у врача часто возникает вопрос: «Если у пациента результаты теста положительные, насколько велика вероятность того, что он болен?» Данная величина называется положительным прогнозируемым значением результатов теста (ППЗ). Аналогично вводится понятие отрицательного прогнозируемого значения (ОПЗ): если результат теста отрицателен, то какова вероятность того, что пациент не болен? Значения данных величин зависят не только от технических характеристик теста, но и от распространенности диагностируемого заболевания.

Пример оценок ППЗ и ОПЗ. Предположим, что проводилось тестирование группы населения, в которой истинная распространенность заболевания составляет 5%. Реальные чувствительность и специфичность теста составляют 95%. Каковы значения ППЗ и ОПЗ? Предположим, что было протестировано 2 000 человек, тогда в этой группе реально болеют 100 человек, а 1 900 человек здоровы. Из 100 реально больных тест с наибольшей вероятностью «признает» больными 95 (чувствительность 95%), 5 результатов будут ложноотрицательными. Из 1 900 реально здоровых тест «признает» здоровыми 1 805 человек (специфичность 95%), 95 результатов будут ложноположительными. Таким образом, вероятность того, что пациент с положительным результатом теста действительно болен, равна отношению истинно положительных результатов теста к сумме истинно положительных результатов теста и ложноположительных. Истинно положительных результатов имеем 95, ложноположительных тоже 95. Поэтому ППЗ будет равно $95/(95 + 95) = 0.5$ или 50%. Аналогично ОПЗ будет равно $1\,805/(1\,805 + 95) = 0,997$ или 99,7%.

Данный результат требует некоторого осмысления. Распространенность заболевания 5%, специфичность теста 95%, но в половине положительных случаев результаты теста ошибочны!

Более того, если распространенность заболевания ниже, то ППЗ резко падает. Хочется отметить, что возрастает не вероятность получения ложноположительного результата (данная вероятность определяется специфичностью теста), а вероятность того, что пациент с положительным результатом теста здоров. В таблице приведены значения ППЗ и ОПЗ для тестов с чувствительностью и специфичностью 95%, 98% и 99% для разных величин истинной распространенности заболевания.

Таблица 4

Истинная распространенность заболевания (%)	Чувствительность и специфичность 95%		Чувствительность и специфичность 98%		Чувствительность и специфичность 99%	
	ППЗ	ОПЗ	ППЗ	ОПЗ	ППЗ	ОПЗ
1	16	99,9	33	99,9	50	99,9
2	27,9	99,9	50	99,9	66,9	99,9
5	50	99,7	72	99,9	83,9	99,9
10	67,9	99,4	84	99,8	91,7	99,9
20	82,6	98,7	91	99,5	96,1	99,7
50	95	95	98	98	99	99
75	98,3	83,7	99	94	99,7	97
100	100		100		100	

Следует отметить, что значения ППЗ и ОПЗ не являются техническими характеристиками диагностического теста, а являются величинами, учитывающими как технические характеристики, так и особенности группы населения, в которой применяется тест. Значения ППЗ и ОПЗ равны в точности значениям чувствительности и специфичности соответственно только в том случае, если истинная распространенность заболевания в тестируемой группе равна 50%.

Для лечащего врача знания значений ОПЗ и ППЗ представляют большую ценность, чем знание специфичности и чувствительности диагностического теста.

Примеры использования значений ППЗ и ОПЗ

Пример 1. При использовании тест-системы для выявления антител к ВГС лишь в половине случаев положительные результаты подтверждаются при использовании комплекса других диагностических методов (реальная статистика одной из стран мира в 1998 г.). Считая распространенность заболевания равной 1%, оценить чувствительность и специфичность тест-системы.

Предполагаем чувствительность равной 100%. Тогда при проверке 1000 человек реально больных будет 10 (распространенность заболевания равна 1%) и все они будут выявлены (чувствительность 100%). При ОПЗ равной 50% количество выявленных реальных больных равно количеству ложноположительных результатов, поэтому количество ложноположительных равно 10. Таким образом получаем специфичность около 99% $((990 - 10) : 990)$.

Предполагаем чувствительность равной 80%. Тогда реальных больных будет выявлено 8 из 10, и ложноположительных результатов тоже будет 8. Специфичность получаем около 99% $((990 - 8) : 990)$.

Предполагаем чувствительность равной 50%. Тогда специфичность равна примерно 99,5% $((990 - 5) : 990)$.

Таким образом, имея набор данных, представленных в условиях примера, можно только оценить специфичность (около 99%), о чувствительности ничего сказать нельзя.

Пример 2. Как оценить ППЗ, если последовательно использовались 2 различных теста с чувствительностью и специфичность 95%, распространенность заболевания в исследуемой популяции составляет 1%, а результаты тестов оба раза дали положительный результат?

Пользуясь таблицей значений ППЗ и ОПЗ находим ППЗ после применения 1 теста (16%). Если рассматривать группу лиц, для которых после применения одного такого теста результаты положительны, то можно с большой долей уверенности утверждать, что распространенность заболевания в этой группе составляет 16%. Если после применения другого теста результат положителен, то величину ППЗ можно оценить уже в 70–75% (она находится между значениями для распространенности 10–67,9% и 20–82,6%). Следует отметить, что данные рассуждения верны только при применении различных тестов, например различных производителей или принципиально отличающихся тестов одного производителя (лизатные или рекомбинантные тест-системы, поликлональные или моноклональные тест-системы и т.п.).

Пример 3. В США хорошим показателем работы службы переливания крови считается уровень заражений гепатитом В не более 2 на 100 000 переливаний. Считая носительство в группе доноров равной 5%, оценить чувствительность и специфичность тест-систем, необходимую для непревышения необходимого уровня зараженности.

Для проверки крови в США используются тест-системы для выявления HBsAg и антител к HBcAg. Будем считать, что чувствительность и специфичность тест-систем равны, а также, что оплошность при взятии крови, маркировке образцов и постановке анализа нет. Тогда уровень заражений 2 на 100 000 можно представить как ОПЗ равное 99,998% (если результат анализа отрицательный, то в 99 998 случаях из 100 000 доноры действительно были здоровы).

Сделаем оценку для чувствительности и специфичности 98%. При постановке первой тест-системы из 100 000 обследованных тест-система выявит 5 000 (количество реально инфицированных) \times 0,98 (чувствительность тест-системы) = 4 900 положительных образцов, 100 человек будут ошибочно признаны здоровыми. При постановке образцов от этих 100 человек вторая тест-система ошибочно определит 2 образца как отрицательные (чувствительность 98%). Таким образом для поддержания указанного уровня безопасности переливаний достаточно тест-систем с чувствительностью и специфичностью около 98%.

В данном случае дополнительно было сделано предположение, что инфицированные обязательно имеют в крови оба маркера гепатита В.

Пример 4. Изменим условия примера 3. Предположим, что в результате некоторых мероприятий (исключение групп риска) удалось снизить носительство в группе доноров до 2,5%. Оценить уровень безопасности переливаний для тест-систем с чувствительностью и специфичностью 98%.

При постановке первой тест-системы из 100 000 обследованных тест-система выявит 2 500 (количество реально инфицированных) \times 0,98 (чувствительность тест-системы) = 2 450 положительных образцов, 50 человек будут ошибочно признаны здоровыми. При постановке образцов от этих 50 человек вторая тест-система ошибочно определит 1 образец как отрицательный (чувствительность 98%). Таким образом, уровень безопасности будет примерно равен 1 на 100 000 переливаний.

Ниже приведен график распространения посттрансфузионного гепатита в США, в котором отражено влияние принятых мер, направленных на снижение распространенности. Следует учитывать, что в указанный на графике период времени качество тест-систем непрерывно улучшалось.

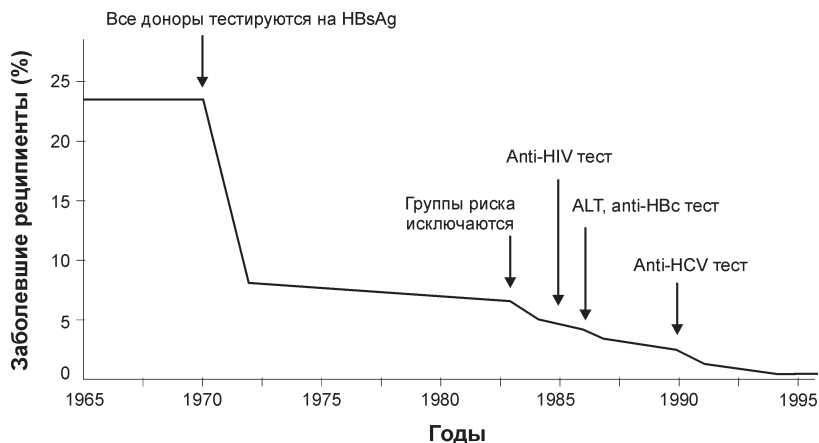


Рис. 3. Посттрансфузионный гепатит*, Соединенные Штаты

* — клинические и субклинические формы гепатитов у пациентов с многократными переливаниями крови

Предлагаемая методика подготовки одноразовых наконечников для пипеток к повторному использованию

Наконечники для автоматических пипеток желательно использовать однократно. Предлагаемая ниже методика рассчитана только на такие лаборатории, у которых нет возможности однократного использования наконечников.

1. Замачивание в 6% растворе перекиси водорода, содержащем 0.5% жидкого моющего средства (типа жидкости для мытья посуды серии «Клер» по ТУ 2383-001-26332142-99) или хозяйственного мыла (50 г на 10 л воды) на 24 часа.

Категорически запрещается использовать СМС в виде любых стиральных порошков!

2. Промывка 10 раз холодной водой.

3. Промывка 2 раза дистиллированной водой.

4. Кипячение в третьей порции дистиллированной воды не менее 40 минут.

5. Сушка в сухожаровом шкафу при 80°C не менее 5–6 часов до полного высыхания.

6. Раскладка наконечников в штативы только пинцетом!

Возможно использование других методик, важно чтобы были учтены следующие моменты:

- замачивание в 6% растворе перекиси,
- промывка после перекиси,
- кипячение,
- высушивание.

Желательно разделить наконечники на предназначенные для работы с конъюгатом, с сыворотками, с растворами хромогенов (отдельно ТМБ и ОФД), не допуская последующего их перемешивания.

Дезинфекция

Возможный вопрос: существует приказ № 408 от 12.07.89 года «О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в стране», который вроде бы обязывает обязательно использовать синтетические моющие средства типа «Лотос», «Айна» и т.п. при обработке лабораторной посуды. В инструкциях по применению зачастую указано о запрете использования СМС для мытья посуды, например, предназначенной для растворов ОФД.

Согласно п. 20 таблицы 1 «Методы и средства дезинфекции объектов при вирусных гепатитах» данного приказа имеется выбор в составе дезинфицирующего раствора – возможно использование 6-процентного раствора перекиси водорода без добавления моющих средств с замачиванием на 60 минут. В таблице 2 «Дезинфекция изделий медицинского назначения» при описании химического способа дезинфекции также имеется выбор в составе дезинфицирующего раствора – возможно использование 6-процентного раствора перекиси водорода без применения моющих средств.

Следует учитывать, что приказ готовился в конце 80-х годов, когда метод ИФА только начинал широко распространяться в бывшем СССР. Автор выражает надежду, что наших читателей контролирующие организации не заставляли дезинфицировать автоматические пипетки методом полного погружения в дезинфицирующий раствор, согласно п. 20 таблицы 1 приказа. Естественно, под словом «пипетки» авторы приказа понимали только стеклянную их разновидность.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Помещение	4
2. Оборудование и расходные материалы	6
3. Подготовка образцов	10
4. Инструкция по применению	11
5. Действия во внештатной ситуации	18
6. Внешний и внутренний контроли	20
7. Сравнение с результатами других диагностических методов	21
Приложение	22
Чувствительность и специфичность.....	22
Как правильно сравнить две тест-системы?.....	23
Типичные ошибки при сравнении тест-систем,.....	24
оценке чувствительности и специфичности.....	24
Прогнозируемые значения.....	27
Примеры использования значений ППЗ и ОПЗ.....	29
Предлагаемая методика подготовки одноразовых.....	31
наконечников для пипеток к повторному	31
использованию.....	31
Дезинфекция	32

Информационно-методическое пособие

А.В. Масяго

**НЕКОТОРЫЕ ОШИБКИ
ПРИ ПОСТАНОВКЕ ИФА**

Оригинал-макет: *А.В. Ласская*

Подписано в печать 25.11.10. Бумага офсетная. Формат 60×84/16.
Усл. печ. л. 2,25. Уч-изд. л. 2,85. Доп. тираж 1 000 экз.

Отдел оперативной печати ЗАО «Вектор-Бест».
630559 Новосибирская обл., пгт. Кольцово, а/я 121.