

В. С. КАМЫШНИКОВ, М. А. ЧЕРНОВЕЦКИЙ

**ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ:
ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ И
ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ ВАРИАНТЫ
ЕГО РЕАЛИЗАЦИИ,
УСЛОВИЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ
НАДЕЖНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Минск БГМУ 2024

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

В. С. Камышников, М. А. Черновецкий

**ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ:
ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ И ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ
ВАРИАНТЫ ЕГО РЕАЛИЗАЦИИ,
УСЛОВИЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ
НАДЕЖНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Учебно-методическое пособие



Минск БГМУ 2024

УДК 616-074:57.083.3(075.9)

ББК 53.47я78

К18

Рекомендовано Научно-методическим советом университета в качестве учебно-методического пособия 17.01.2024 г., протокол № 13

Рецензенты: д-р биол. наук, зав. клинко-диагностической лабораторией Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова Л. А. Державец; каф. клинической лабораторной диагностики Гомельского государственного медицинского университета

Камышников, В. С.

К18 Иммунохимический анализ: иммуноферментный и иммунофлюоресцентный варианты его реализации, условия обеспечения диагностической надежности исследования : учебно-методическое пособие / В. С. Камышников, М. А. Черновецкий. – Минск : БГМУ, 2024. – 58 с.

ISBN 978-985-21-1507-0.

Содержит основное представление о видах иммунохимического анализа, все более широко используемого в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений на базе современного высокотехнологичного оборудования. Изложен алгоритм исследования с применением различных технологий иммуноферментного и иммунофлюоресцентного анализа. Особое внимание уделено предупреждению возникновения погрешностей на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах исследования.

Предназначено для слушателей, осваивающих содержание образовательных программ переподготовки по специальности «Клиническая лабораторная диагностика», повышения квалификации врачей клинической лабораторной диагностики, биологов клинко-диагностических лабораторий и других специалистов клинического и медико-диагностического профиля, а также специалистов санитарно-гигиенической (медико-профилактической), химико-токсикологической и судебно-медицинской службы.

УДК 616-074:57.083.3(075.9)

ББК 53.47я78

ISBN 978-985-21-1507-0.

© Камышников В. С., Черновецкий М. А., 2024

© УО «Белорусский государственный медицинский университет», 2024

ВВЕДЕНИЕ

Иммунохимические методы исследования нашли широкое использование в клиничко-лабораторной практике для выявления возбудителей инфекционных и паразитарных заболеваний, токсинов, определения уровней гормонов, опухолевых антигенов, диагностики аллергии, аутоиммунных болезней и других патологических состояний [1]. В основе этих методов анализа лежит реакция «антиген-антитело», сопровождаемая образованием иммунных комплексов, выявляемых различными методами химического или физико-химического исследования.

Применение высокоспецифичных иммунохимических методов анализа позволяет осуществлять:

- определение антигенов как этиологических факторов заболевания (инфекционной и другой природы), для обнаружения которых используют специфические (по отношению к соответствующим антигенам) антитела;
- определение антител: по метаболическому либо другому эффекту, отражающему формирование иммунных комплексов с заведомо известными антигенами.

ВИДЫ ИММУНОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Иммуноферментный анализ (ИФА) – лабораторный иммунологический метод выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса «антиген-антитело» по реакции ферментативной метки, включенной в один из его компонентов, на соответствующий субстрат, разрушение которого сопровождается появлением окраски. Проведение любого варианта ИФА состоит в оптической регистрации продуктов ферментативных реакций в ходе тестирования исследуемых образцов, «негативных» и «позитивных» контрольных проб.

В большинстве случаев индикатором реакции служит способность энзимов вызывать изменения бесцветного субстратного раствора с образованием в конечном итоге окрашенного продукта.

Экологическая чистота, высокая специфичность и воспроизводимость, возможность использования отечественной аппаратуры и доступных наборов реагентов открывают перспективы широкого использования иммунохимического анализа в области не только клинично-лабораторных, но также химико-токсикологических, судебно-медицинских и санитарно-гигиенических исследований.

Иммунологические реакции в ИФА протекают в две фазы, на первой из которых происходит специфическое связывание антител и антигенов, а на второй — неспецифическое проявление реакции, характеризующееся внешними признаками образования иммунных комплексов «антиген-антитело».

В качестве метки, как правило, используют ферментативные метки, но также флуоресцентные и хемилюминесцентные маркеры.

Виды ИФА

Существующие виды иммуноферментного анализа могут быть классифицированы на основании различных критериев.

По используемому месту проведения реакции:

- жидкофазный (гомогенный);
- твердофазный (гетерогенный).

Гомогенный ИФА

Все стадии реакции протекают в растворе (жидкой фазе), содержащем антигены и антитела, без разделения образовавшихся иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов. Ферментативная активность метки может как уменьшаться, так и увеличиваться, что обусловлено природой воздействия лигандов (связывающихся компонентов) на ферментативную активность. Таким образом после образования в растворе иммунохимического комплекса происходит измерение ферментативной активности, которая пропорциональна концентрации свободного (или связанного) меченного компонента реакции. Данный вариант ИФА в основном используется для определения низкомолекулярных субстанций (токсических, наркотических и лекарственных средств).

Гетерогенный ИФА

Объединяет методы, в которых анализ проводится в двухфазной системе, при этом разделение может происходить на любой стадии определения. В целях удобства классификации целесообразно проводить дополнительное разделение гетерогенных методов по характеру проведения первой стадии «узнавания». Антиген или антитело используются в иммобилизованном состоянии и таким образом специфических иммунокомплекс «антиген-антитело» формируется на твердой фазе. Подобный вариант представляет собой классический твердофазный тип ИФА (solid phase immunoassay, ИФА, enzyme linked immunosorbent assay — **ELISA**). В качестве одного из вариантов может быть гомогенно-гетерогенный твердофазный ИФА при котором на первой стадии образование иммунокомплексов идет в растворе, а для разделения используют твердую фазу с иммобилизованным реагентом.

По варианту проведения реакции (рис. 1):

- прямой;
- непрямой;
- конкурентный;
- сэндвич (sandwich) - реакция.

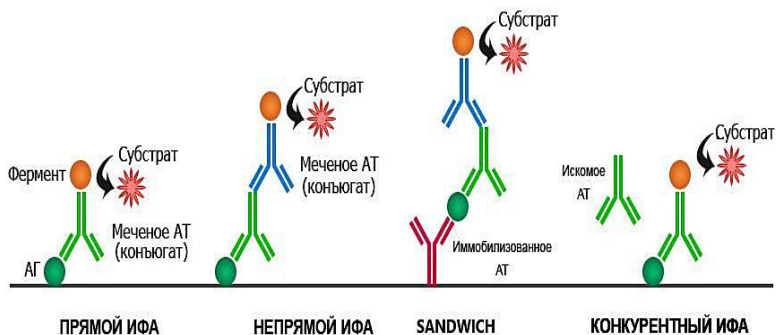


Рис. 1. Варианты проведения ИФА

ИФА называют прямым или непрямым в зависимости от типа антител, маркированных ферментом. В прямом варианте метода определяемый антиген обнаруживают конъюгатом гомологичных (полученных к данному антигену и специфичных ему антител). В непрямом ИФА для связывания целевого антигена используют немеченные гомологичные антитела, а затем образовавшийся ком-

плекс «антиген-антитело» выявляют при помощи меченных ферментом других (вторичных антивидовых антител), которые направлены против изначально используемых немеченных гомологичных антител.

Отличительной чертой конкурентного варианта является присутствие на одной из стадий реакции искомого объекта (антигена или антител) одновременно с таким же, заведомо известным немеченым анализом. При этом происходит их конкуренция за взаимодействие с ограниченным числом сайтов (мест связывания), находящихся

на твердой фазе соответствующих белковых структур. В результате реакции ферментативная активность реакции оказывается обратно пропорциональной количеству искомым антител либо антигенов в исследуемом образце.

Если на стадии проведения выявления специфического иммунокомплекса антиген оказывается «зажатым» между иммобилизованных на твердой фазе и мечеными ферментом антителами, то в таком случае уместно использование термина «sandwich»-реакция.

По конечной цели проведения:

- качественный (наличие либо отсутствие анализа в исследуемой пробе материала);
- количественный (количественное определение содержания анализируемых веществ).

По использованию оборудования для проведения реакции:

- открытый (возможность применения различных видов оборудования для проведения реакции и учета ее результатов);
- закрытый (необходимость использования конкретного вида анализаторов).

По объекту исследования (рис. 2):

- выявление специфических антител;
- выявление специфических антигенов.



Рис. 2. Схема выявления антител и антигенов при помощи ИФА

Специфические антитела могут выявляться как при помощи сорбированных на твердой фазе антигенов в варианте прямого, непрямой и конкурентного ИФА, так и за счет предварительного связывания специфического антигена с твердой фазы при помощи соответствующих немеченных иммобилизованных антител.

В свою очередь специфические антигены, могут быть выявлены при помощи прямой и непрямой ИФА с мечеными антителами, а также при помощи конкурентной реакции с использованием сорбированных на твердой фазе соответствующих иммобилизованных антигенов.

ПРИНЦИП ТВЕРДОФАЗНОГО ИФА

Наиболее широко используемый в практике работы лабораторий принцип твердофазного (микропланшетного, пробирочного, а также с использованием вносимых в пробирки шариков, звездочек, шестиренок) иммуноферментного анализа для выявления антител (либо антигенов) состоит в формировании комплекса «антиген-антитело», напоминающего собой «слоенный пирог» в котором определяемое (искомое) вещество (антиген либо антитело) составляет один из внутренних слоев, а индикаторный фермент – внешний наружный элемент.

В качестве ферментных меток чаще всего используется пероксидаза (из корня хрена), щелочная фосфатаза и бета-галактозидаза. При воздействии фермента на содержащийся в субстратной жидкости хромоген образуется окрашенный продукт, об интенсивности окраски которого судят по оптической плотности фотометрируемого раствора.

МЕТОДОЛОГИЯ ИФА

1. Антитела (либо антигены) исследуемой биологической жидкости реагируют с иммобилизованными на твердой фазе специфическими антигенами (либо антителами).

2. В реакцию вводят меченые ферментом антитела, которые связываются с искомыми антителами (либо определяемыми антигеном).

3. В реакцию вводится раствор хромоген, изменяющий свою окраску под воздействием фермента. Ферментативная активность находится в пропорциональной (прямой или обратной) зависимости с количеством искомого анализита в исследуемом биологическом материале.

4. Результат реакции учитывается спектрометрически.

В практике работы большинства клинико-диагностических лабораторий выявление специфических антигенов методом ИФА является более востребованным по сравнению с детекцией соответствующих антител.

При использовании плашечного (микропланшетного) твердофазного ИФА определение выполняют в лунках 96-луночного микропланшета (цельного либо стрипированного), дно и стенки которого (твердая фаза) изготовлены из специального материала (типа полистирола), эффективно адсорбирующего антигены и антитела (рис. 3).

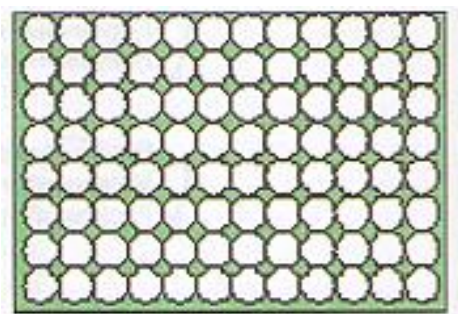


Рис. 3. 96-луночный полистирольный микропланшет

Для примера. Сначала вносят в ячейки (лунки) планшета специфические антитела (например, кроличьи антитела против челове-

ческого альбумина), а затем (после их адсорбции на стенках и удаления избытка) добавляют исследуемую пробу. Содержащиеся в ней молекулы антигена через посредство антител оказываются фиксированными на стенках лунки.

После этого добавляют меченные ферментом антитела (в приведенном случае – против человеческого альбумина), фиксирующиеся на тех же альбуминовых молекулах, которые другими группировками адсорбированы на антителах, иммобилизированных на твердой фазе.

При этом количество фиксированных антител, меченных ферментом оказывается прямо пропорциональным содержанию альбумина в исследуемой пробе.

После добавления каждого реагента и завершения реакции его связывания избыток непрореагировавших белков *тщательно удаляют путем отмыванием твердой фазы буферным раствором.*

На последующем этапе анализа в лунку планшета добавляют хромогенный субстратный раствор, содержащий орто-фенилендиамин (ОФД) либо тетра-метилбензидин (ТМБ) и перекись водорода. Под воздействием фермента хромогенный раствор превращается из бесцветного в окрашенный, интенсивность окраски которого измеряется через определенное время фотометрически при помощи микропланшетного спектрофотометра.

С целью повышения специфичности выявления антигена может использоваться непрямой «sandwich»-вариант, при котором вводится дополнительный этап предварительного связывания детектируемого антигена (в данном случае человеческого альбумина) немечеными вторичными антителами с последующей фиксацией их антивидовыми антителами, конъюгированными ферментом (рис. 4).

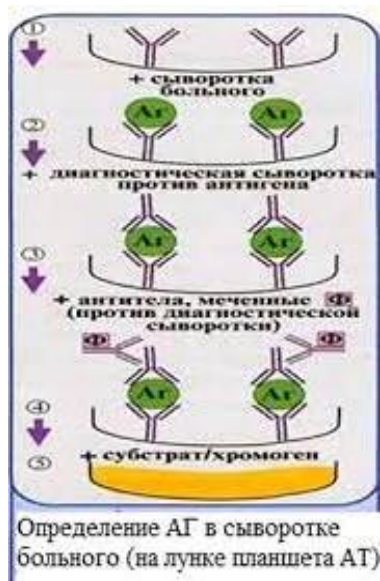


Рис. 4. Схема определения антигена в микропланшете, в варианте непрямого «сэндвич»-ИФА

Подобным образом ИФА может проводиться не только в иммунологическом планшете, но и в пробирках с полистироловыми шариками (рис. 5, 6).

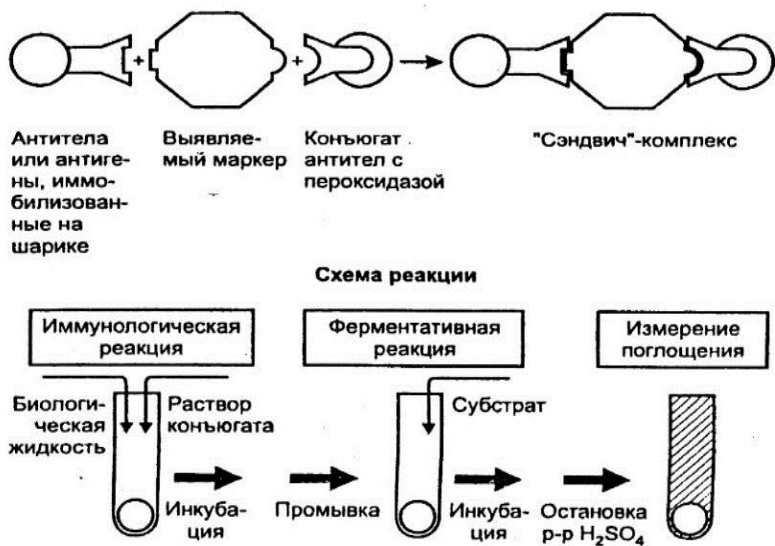


Рис. 5. Схема выполнения ИФА по выявлению антигена в пробирке с полистироловыми шариками

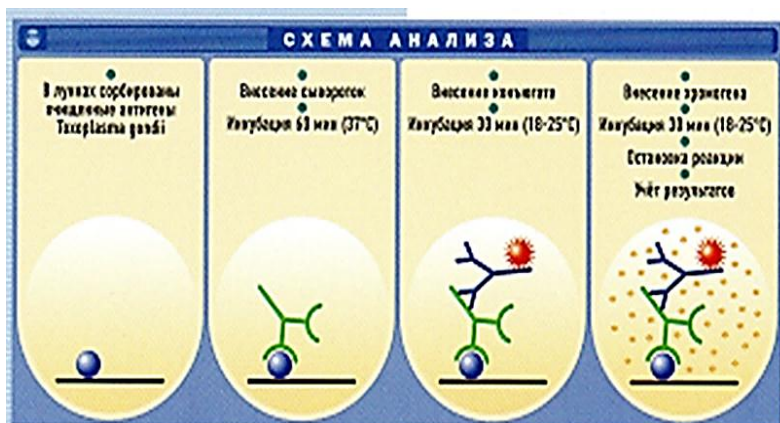


Рис. 6. Схема определения специфических антител в микропланшете методом ИФА

ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ: ЕГО ОТДЕЛЬНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ

Фотометр универсальный Ф300ТП

Выпускаемое предприятием «ВИТЯЗЬ» оборудование – «Фотометры универсальный Ф300ТП, (Ф300)» с вертикальным типом фотометрирования позволяют реализовать одноволновой и двухволновой методы измерения (рис. 7).



Рис. 7. Фотометр универсальный Ф300 (Ф300ТП) с вертикальным типом фотометрирования

Иммуноферментные анализаторы применяются для работы с планшетами, состоящими из 96 ячеек (микрокуветок).

Фотометр универсальный Ф300ТП предназначен для измерения оптической плотности растворов в 96 луночном плоскодонном цельном или разборном планшете с последующей обработкой результатов встроенным микроконтроллером в соответствии с алгоритмами иммуноферментных исследований. Измерение производится по восьми независимым каналам с вертикальным прохождением луча. Прибор позволяет проводить исследования с применением тест-системы открытого типа.

Высокую оценку специалистов получило семейство аналогичных микроплашенных анализаторов производства фирм стран дальнего зарубежья, типа «Multiscan FC» (Thermo Fisher Scientific, США), с возможностью измерения оптической плотности в диапазоне

340–850 нм. Прибор позволяет осуществлять автоматизированные процедуры учета и интерпретации результатов иммуноферментных исследований по определению уровней гормонов, онкомаркеров,

аллергенов, выявления маркеров инфекционных и паразитарных и протозойных заболеваний.

Наряду с плашечными иммуноферментными анализаторами находят применение автоматизированные приборы, в которых вместо плашек используются шарики, звездочки, и другие структуры, покрытые иммуносорбентом (рис. 8).



Рис. 8. Иммуноферментный автоматический анализатор

Автоматические устройства отмывки иммунологических планшетов (типа «МВ-350» и «УСОТ», производства Республика Беларусь)

Режимы работы МВ-350:

1. Промывка планшетов с различной конфигурацией дна. Придонная отмывка.
2. Отмывка в режиме переполнения.
3. Аспирация планшетов с различной конфигурацией дна.
4. Дозировка раствора, включая дозировку в режиме переполнения.
5. Промывка каналов в автоматическом режиме.
6. Обработка любого стрипа планшета по индивидуальной программе.
7. Прочее.

Для отмывки иммунологических планшетов используются, также, аналогичные автоматические микропланшетные промыватели

(вошеры) зарубежных производителей типа «MultiWash» (Molecular Devices, США) и «WellWash» (Thermo Fisher Scientific, США), позволяющие программировать и проводить отмывку планшетов с различными формами конфигурации дна лунок.

Отечественные тест-системы для иммуноферментного и иммунофлуоресцентного анализа

Отечественные наборы реагентов создаются на базе ряда научно-производственных предприятий Республики Беларусь, специализированных отделов (лабораториях) РНПЦ МЗ РБ. Среди них особо значима деятельность Института биоорганической химии и Хозрасчетного опытного предприятия Национальной академии наук Беларуси (ХОП ИБОХ НАН Беларуси).

ХОП ИБОХ НАН Беларуси в настоящее время производит ИФА-наборы реагентов с использованием в качестве таковых моноклональных антител и *применением наиболее совершенной – стрептавидин-биотиновой технологии их иммобилизации.*

В перечень разработанных отечественных наборов реагентов входят: ИФА-Т4, ИФА-ТТГ, ИФА-ТГ, ИФА-АНТИ-ТГ, ИФА-ФЕРРИТИН, ИФА-тестостерон, ИФА-прогестерон, ИФА-эстрадиол, ИФА-кортизол (и другие) (рис. 9).



Рис. 9. Ассортимент отечественных наборов реагентов для ИФА, производимых на базе Хозрасчетного Опытного Предприятия Института биоорганической химии Национальной Академии Наук Беларуси

Научно-производственные лаборатории созданы и в ряде республиканских научно-практических центрах (в том числе РНПЦ

эпидемиологии и микробиологии, РНПЦ гематологии и медицинских биотехнологий МЗ РБ).

Так, например, высокую оценку специалистов получили разработанные в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии иммуноферментные и иммунофлюоресцентные тест-системы для диагностики различных вирусных, бактериальных и паразитарных заболеваний. Среди многочисленных тест-систем: наборы реагентов для диагностики ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов, клещевого энцефалита; аденовирусной инфекции, болезни Лайма, ротавирусной инфекции, хламидиоза, энтеровирусной и респираторно-синтициальновирусной инфекций.

Важно иметь в виду и то, что спектр диагностических препаратов, изготавливаемых в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, во многом определен спецификой краевой патологии, т.е. тем перечнем основных инфекций, которые наиболее характерны и актуальны для нашей страны.

В РНПЦ трансфузиологии и медицинских технологий МЗ РБ производятся иммуноферментные тест-системы для определения антител к гликопротеину и кардиолипину.

Следует иметь в виду, что наряду с рядом достоинств ИФА-наборам реагентов присущи и некоторые *недостатки*.

Погрешности, могущие возникать при реализации технологий иммуноферментного анализа:

– в результате присоединения фермента к антителу может существенно измениться конформация обеих макромолекул, что способно привести к частичной или полной потере ферментативной или антигенсвязывающей способности белков;

– на результаты ИФА способны оказать воздействия ряд соединений, присутствующих в образце и тем или иным образом ингибирующих каталитическую активность энзима (так называемые «ферментные яды»).

Эти и другие обстоятельства заставляют обратиться к другим, более совершенным технологиям иммунохимического исследования, среди которых оказался ***иммунофлюоресцентный анализ***.

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИММУНОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ)

Метод иммунофлюоресценции был создан Coons et al. В 1941 г., впервые установивших возможность присоединения флюоресцентных красителей к молекулам иммуноглобулинов без нарушения их специфической активности [2].

ВАРИАНТЫ (ТЕХНОЛОГИИ) ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

1. Твердофазная флюоресценция.
2. Лантанидный иммуофлюориметрический и поляризационно- флюоресцентный анализ.
3. Электро-хемилюминесцентный анализ.

В основе технологии исследования лежит использование в качестве *флюоресцентных меток* – соединений, обладающих способностью испускать свет.

Первыми флюоресцентными метками для антител или антигенов оказались органические красители *флюоресцеин и родамин В*.

ПРИНЦИП И ЭТАПЫ ВЫПОЛНЕНИЯ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Антитела фиксируют на твердом носителе, после чего вносят антигены, участвующие в формировании комплекса «антиген-антитело». После этого добавляют меченные флюоресцеином (либо другим люминофором) антитела и проводят реакцию связывания; избыток материала удаляют отмыванием и измеряют флюоресценцию.

Ход аналитического исследования включает следующие последовательно выполняемые стадии:

1. К фиксированным на твердом носителе (внутренней стенке пластиковых пробирок или ячеек пластикового планшета, а также на поверхности шариков (звездочек из полистиролового латекса) антителам привносятся соответствующие антигены биологических жидкостей.

2. В случае использования шариков пробу центрифугируют и удаляют (сливанием) жидкость, содержащую все несвязавшиеся компоненты реакции.

3. Добавляют меченные флюоресцеином (либо эозином, другими люминофорами) антитела, и проводят реакцию связывания.
4. Избыток исследуемого материала удаляют отмыванием.
5. Замеряют флюоресценцию.

Чаще всего используется метод с усилением люминесцентного свечения. Усиление люминесценции достигается добавлением люминогенного субстрата, люминола или изолюминола, и специального усилителя интенсивности и продолжительности свечения, что обеспечивает высокую чувствительность и воспроизводимость. Световой сигнал регистрируется специальным анализатором (люминометры).

АППАРАТУРА, ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ТВЕРДОФАЗНОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

Для проведения подобных исследований предназначено оборудование типа «Fluoroskan», «Luminoskan» фирмы «Thermo Fischer Scientific» производства европейских государств и США (рис. 10).



Рис. 10. Иммунофлюориметрический анализатор

Как и в случае с иммуноферментным анализом иммунофлюориметрическому виду исследования (основанному на использовании вторичного антитела, конъюгированного с люминофором вместо фермента) присущи как достоинства, так и недостатки.

Основное достоинство метода иммунофлюоресценции состоит в отсутствии необходимости проведения ферментативной реакции, что упрощает процедуру исследования.

Недостатком является неспецифическое свечение фона, избавиться от которого нередко оказывается весьма сложно. При использовании флюоресцентных меток (люминофоров) оказалось практически невозможным существенно снизить световой фон *из-за сопутствующей флуоресценции белковых молекул и рассеяния света*, создаваемого структурными элементами самой исследуемой биологической жидкости, что заставило обратиться к другим технологиям исследования.

Указанный недостаток иммунофлюоресцентного анализа удалось устранить благодаря применению технологий регистрации флуоресценции *по измерению сигнала с его задержкой во времени* или по использованию поляризации флуоресценции. Все это позволило снизить сигнал фона (либо полностью устранить его влияние) без потери аналитической чувствительности исследования.

Измерение сигнала с задержкой во времени стало возможным благодаря применению технологии лантанидного иммунофлюоресцентного (иммунофлюориметрического) анализа.

ЛАНТАНИДНЫЙ ИММУНОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ: НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В лантанидном иммунофлюориметрическом анализе (ЛИФМА) возбуждение и регистрация флуоресцентного сигнала осуществляется с временным разрешением. Это обеспечивает не только сверхчувствительность, но и возможность выполнения исследования в широком диапазоне показателей концентрации определяемого продукта.

Принцип исследования состоит в следующем:

– при поглощении кванта монохроматографического светового потока определенной длины волны органическая молекула переходит с нижнего синглетного состояния в возбужденное. Затем она возвращается на исходный энергетический уровень, что сопровождается испусканием света большей длины волны (флуоресценция лиганда);

– разница между длинами волн света, поглощенной и выделенной органической молекулой с включенной в нее флюоресцентной меткой (ионом металла), - сдвиг Стокса, составляет более

150 нм, что позволяет избежать неспецифического увеличения сигнала из-за перекрывания спектров возбуждения и испускания.

Этому во многом способствует то, что свечение анализируемого образца возбуждают коротким импульсом света, а интенсивность флуоресценции измеряют спустя 100–400 мкс после этого при длине волны, соответствующей характеристикам конкретного лантанида.

За время интервала 100–400 мкс интенсивность флуоресценции фона затухает, и измеряемый сигнал оказывается обусловленным только флуоресцентной меткой.

Применение различных способов регистрации флуоресценции сигнала с задержкой во времени или использование поляризации флуоресценции позволило снизить сигнал фона, повысить специфичность и чувствительность анализа.

В наиболее широко используемом *лантанидном* иммунофлуориметрическом анализе возбуждение и регистрация флуоресцентного сигнала осуществляется с временным разрешением. Это обеспечило сверхчувствительность и широкий динамический диапазон аналитического исследования ионов лантанидов в комплексе с органическими соединениями.

Коммерчески наиболее успешным стал вариант технологий иммунофлуоресцентного (иммунофлуориметрического) анализа **DELFLIA**, разработанный и внедренный в производство группой ученых из *Финляндии*. Это принципиально новый тип иммуноанализа. Дельфия позволяет определять стероидные гормоны в пикограммовых количествах, а гипофизарные гормоны – в концентрации от 0,03 мЕд/л (для ТТГ) до 0,15 мЕд/л (для пролактина). Дельфия является технологией выбора при проведении скрининга на врожденный гипотиреоз и врожденную дисфункцию коры надпочечников (ВДКН), ранее именовавшуюся как адреногенитальный синдром).

В настоящее время подразделение **Wallac Oy** компании **PerkinElmer** производит выпуск как иммунодиагностических наборов реагентов, так и отдельных реактивов для проведения DELFLIA.

Наряду с высоким уровнем аналитической чувствительности основное преимущество DELFLIA заключается в предоставляемой этой технологией возможности одновременного определения не-

скольких соединений благодаря множественному мечению различными лантанидами.

Для формирования светового сигнала в систему вносится специальный усиливающий реагент, что позволяет реализовать технологию, известную как «*Диссоциативный вариант DELFIA*».

В Республике Беларусь поставляемые фирмой PerkinElmer наборы реагентов, содержащие соответствующие моноклональные антитела, меченные Eu^{3+} , нашли применение для одновременного определения по технологии ЛИФМА альфа-фетопротеина, свободной бета-субъединицы хорионического гонадотропина, ассоциированного с беременностью белка плазмы А (ПАББ-А), тиреотропного гормона.

Таким образом, иммунохимические и технические характеристики ЛИФМА обеспечивают высокую аналитическую чувствительность и широкий диапазон определения концентрации веществ, играющих роль биомаркеров ряда заболеваний. Более того, возможность множественного мечения органических комплексов лантанидов позволяет одновременно в одной пробе определять несколько соединений как биомаркеров разных соматических заболеваний.

Другими перспективными направлениями осуществления иммунохимического анализа является использование *технологии иммунологических флюоресцентно-поляризационных и электрохемилуминесцентных исследований*.

ФЛЮОРЕСЦЕНТНО-ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ

В технологии флюоресцентно-поляризационного иммуноанализа (ФПИА) / Flour Escence-Polarization Immunoassay (FPIA), антиген (т.е. гормон, лекарственный препарат – *искусственный антиген*, входящий в состав реагентов) мечен флюоресцирующим веществом (т.е. меткой, флюоресцином).

Молекулы этого вещества способны абсорбировать энергию направляемого на них (*т.е. возбуждающего*) луча света и испускать ее также в форме луча света, но с большей (по сравнению с длиной волны возбуждающего светового луча) длиной волны, возвращаясь при этом в исходное состояние в течении промежутка времени равному примерно 10^{-8} секунды.

Если флюорофоры возбуждены при помощи *поляризованного света*, степень поляризации испускаемого света зависит от скорости вращения флюоресцентной метки в реакционной смеси.

Связывание меченого антигена с антителами (эти два компонента входят в состав реагентов) препятствует вращению (т.е. изменению местоположения) флюорофора в пространстве.

Если за время, прошедшее между поглощением возбуждающего света и его испусканием, *молекула флюорофора не изменила своего положения в пространстве*, тогда свет флюоресценции будет поляризован в той же плоскости в которой поляризован и возбуждающий свет.

ТЕХНОЛОГИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ЭЛЕКТРОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ECLIA (ELECTROCHEMILUMINESCENT IMMUNOASSAY)

Базируются на способности рутения, осмия, рения и других веществ образовывать высоко реакционные соединения на поверхности электрода. К содержащему рутений иммунному комплексу, связанному с магнитными частицами, покрытыми стрептавидином, прикладывают электрическое напряжение, инициирующего развитие иммунохимической (иммунофлюоресцентной) реакции (рис. 11, 12) [2].

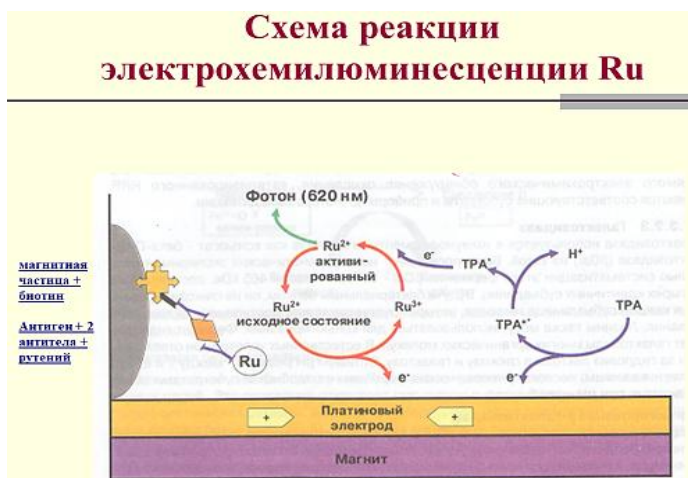


Рис. 11. Схема реакции электрохемилюминесценции Ru

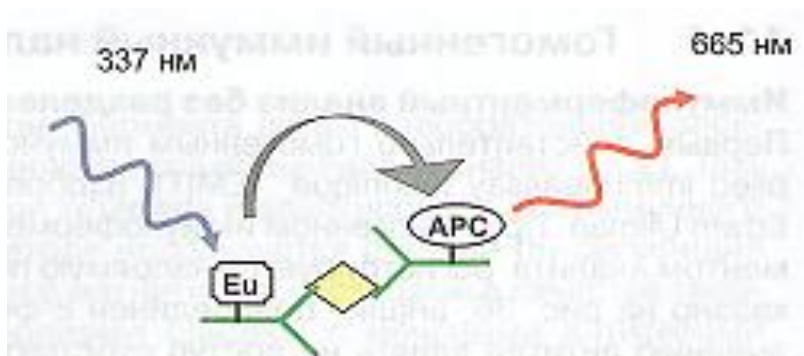


Рис. 12. Сэндвич-исследование с антителами, мечеными европием и аллофикоцианином (APC)

В состав иммунного комплекса входят определяемый антиген и два моноклональных антитела, одно из которых мечено рутением, а другое связано с биотином, обеспечивающим взаимодействие всего иммунного комплекса с магнитными микрочастицами, покрытыми стрептавидином (участие в хемилюминесцентной реакции комплекса «стрептавидин с магнитной частицей – антитело-антиген – антитело-рутений» представлено на рисунке).

Достоинством технологии электрохемилюминесцентных исследований является то, что *линейный режим измерения охватывает изменения концентрации в весьма широком интервале: 6–8 порядков*. Это позволяет исключить разведение проб и значительно сократить продолжительность выполнения аналитической процедуры до 9–18 мин.

АППАРАТУРА, ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ЭЛЕКТРОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Для проведения иммунного анализа по электрохемилюминесцентной технологии используются автоматические анализаторы «ELECSYS 1010», «ELECSYS 2010» с наборами реагентов фирмы «Рош Диагностика», позволяющими одновременно выполнять *без постановки дублирующих проб до шести (1010) и пятнадцати (2010) исследований с производительностью 60 (1010) и 80 (2010) анализов в час, соответственно*.

Для реализации данной технологии исследования достаточно широкое применение нашел иммунохимический анализатор «Cobas e411» (Roche Diagnostics), который представляет собой полностью автоматизированную систему для иммунохимического анализа с использованием реагентов «Roche Diagnostics», (Швейцария). В анализаторе реализована уникальная запатентованная компанией «Roche Diagnostics» современная технология электрохе-миллюминесценции. Принцип метода ЕСLIA основывается на так называемом «сэндвич»-методе. Преимуществами данной технологии являются высокая аналитическая чувствительность метода и широкий диапазон измерения при использовании малого объема образца биологической жидкости, что, в частности, иллюстрируется методом определения ассоциированного с беременностью белка плазмы крови (РАРР-А, ПАПП-А).

Общая продолжительность анализа составляет 18 мин, а процесс исследования состоит из двух последовательных инкубаций определяемого вещества:

- 1-я инкубация: содержащиеся в 15 мкл образца антиген (РАРР-А) взаимодействует с биотинилированным моноклональным РАРР-А-антителом, меченым рутениевым комплексом;
- 2-я инкубация: после добавления микрочастиц, покрытых стрептавидином, образовавшийся комплекс связывается с твердой фазой посредством взаимодействия биотина и стрептавидина.

Реакционная смесь аспирируется в измерительную ячейку, где микрочастицы оседают на поверхность электрода в результате магнитного взаимодействия. Затем с помощью ProCell/ProCell М удаляются не связавшиеся вещества.

После этого приложенное к электроду напряжение вызывает хемиллюминесцентную эмиссию, которая измеряется фотоумножителем.

Результаты определяются с помощью 2-х точечной калибровочной кривой, полученной для данного инструмента, и референсной калибровочной кривой, данные которой «заложены» в штрих-коде набора реагентов.

Калибровка данного набора реагента стандартизирована в соответствии с международным стандартом ВОЗ 78/610 и проводится согласно требованиям к данному реагенту.

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОГО ИММУНОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПОГРЕШНОСТИ, СОПРОВОЖДАЮЩИЕ ИХ ВЫПОЛНЕНИЕ

Содержание отдельных этапов клинико-лабораторного исследования:

1. *Преаналитический (долабораторный) этап.* Включает в себя стадии от назначения анализа врачом-клиницистом до поступления исследуемого образца в лабораторию на рабочее место специалиста, а именно: выбор врачом-клиницистом спектра лабораторных тестов и алгоритма исследования, взятие биологического материала, его предварительную обработку и доставку в лабораторию.

2. *Аналитический этап:* реализация всех стадий ручного (мануального), полуавтоматического или автоматического исследования – вплоть до момента регистрации результатов.

3. *Постаналитический этап:* оформление текстового или электронного бланка результатов исследования, их трактовка (лабораторное заключение), доведение результатов лабораторного анализа

до внимания лечащего врача с целью постановки клинического диагноза, интерпретация результатов исследования (выполняемая совместно врачом клинической лабораторной диагностики и врачом-клиницистом).

Погрешности в выполнении этапов иммунологического анализа могут явиться существенным факторами, негативно влияющими на качество выполнения лабораторно-диагностического исследования пациентов и могущими приводить к ложноположительным или ложноотрицательным результатам. В связи с этим сотрудники клинико-диагностической лаборатории должны располагать информацией о вероятных источниках погрешности в процессе выполнения иммунохимических исследований и об их негативном влиянии на постановку диагноза заболевания, толкование полученных результатов.

ИСТОЧНИКИ ОШИБОК, ХАРАКТЕРНЫХ ДЛЯ ОТДЕЛЬНЫХ ЭТАПОВ ИММУНОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Погрешности, возникающие на доаналитическом (преаналитическом) этапе исследования.

Показано, что наибольшее количество ошибок, возникающих при лабораторном исследовании пациентов, приходится на преаналитический этап его выполнения, включающим в себя процедуры назначения анализа, подготовки пациента, сбора и транспортировки образцов, их регистрации, хранения, разделения и распределения по видам исследования (рис. 13).



Рис. 13. Частота встречаемости (доля в %) среднестатистических ошибок, допускаемых на разных этапах лабораторно-диагностического процесса

Как следует из его рассмотрения, на преаналитическую стадию приходится до 60 % времени, затрачиваемого на лабораторные исследования, причем 20 % времени проведения лабораторного анализа приходится на подготовительные этапы вне клинико-диагностической лаборатории. Появление даже незначительных ошибок на преаналитическом этапе неизбежно приводит к искажению окончательных результатов лабораторных исследований.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП РАБОТЫ

Этот первый этап работы начинается с назначения лечащим врачом перечня необходимых конкретному пациенту лабораторно-диагностических (иммунохимических) исследований. Именно лечащий врач представляет заявку на исследование, регламентирует условия подготовки пациента (например, натощак) и вид биологического материала (кровь, моча, спинно-мозговая жидкость и др.).

Правильное назначение тестов и толкование результатов лабораторных анализов является составной частью деятельности специалистов как клинических, так и клинико-диагностических отделений медицинских учреждений.

Подготовка пациента к клинико-лабораторному исследованию

Значимость его состоит в том, что на него приходится около 20 % от общего количества ошибок.

Основной биологический материал – кровь рекомендуется брать у пациента утром, в одно и то же время (между 7 и 9 часами в стационаре, 8 и 10 часами у амбулаторных пациентов), до физической нагрузки и проведения диагностических процедур. У пациентов, которым предписан *строгий постельный режим*, взятие крови осуществляется также между 7 и 9 часами; при этом рука пациента, лежащего в постели, должна находиться в горизонтальном положении [3].

Всегда следует отмечать точное время взятия пробы в соответствующих документах.

За сутки до взятия крови прием пищи может быть обычным (следует исключить употребление алкоголя: период воздержания от приема алкоголя должен быть не менее 24 часов до взятия биологической жидкости.). За 8–12 часов до взятия крови (а при определении триацилглицеринов – за 10–12 часов) следует воздержаться от еды.

Практически здоровым лицам и амбулаторным пациентам накануне после 2 часов (ночи) запрещаются курение, прием пищи и жидкости (разрешается выпить стакан воды между 22 и 5 часами).

За 8–12 часов до взятия крови должно быть прекращено выполнение диагностических и лечебных процедур.

Непосредственно перед взятием крови пациенту необходимо предоставить отдых в положении сидя в течение не менее 15–30 мин.

Положение тела оказывает влияние на концентрацию многих компонентов сыворотки (плазмы) крови: общего белка, альбумина, креатина, холестерина, триацилглицеринов, активность щелочной фосфатазы, аспаратаминотрансферазы и других компонентов плазмы. *Содержание этих веществ значительно повышается в вертикальном положении пациентов и уменьшается – в горизонтальном.* Следует, однако, иметь в виду, что при пребывании человека

в течение нескольких часов в горизонтальном положении объем плазмы в русле крови оказывается на 10–15 % больше, чем у пациента, сохраняющего обычный двигательный режим. *Поэтому концентрация веществ в крови человека, лежавшего более часа, всегда ниже.* В связи с этим для исключения влияния изменения положения тела обследуемый должен находиться в покое, сидеть или лежать не менее 5 мин (!).

При динамическом наблюдении за пациентом взятие материала нужно проводить при идентичном положении тела пациента.

Для выполнения иммунологических и биохимических исследований чаще применяют сыворотку крови. Использование венозной крови более предпочтительно, чем капиллярной, так как венозная кровь более достоверно отражает состояние организма; к тому же, при ее получении возникает меньше ошибок и она может быть взята в большем объеме.

Взятие венозной крови осуществляется процедурной медсестрой. Непосредственно перед этим участок кожи обрабатывается ватным тампоном с 70 % спиртом (хлоргексидин). Перед взятием крови дезинфицирующее средство должно испариться с поверхности кожи.

При *взятии крови путем венопункции* период времени сдавления сосудов жгутом по возможности должен быть минимальным (не более 1 мин). Чрезмерно продолжительное наложение турникета, а следовательно, длительное пережатие в области плеча приво-

дит

к сгущению крови (гемоконцентрации) и увеличению содержания находящихся в ней компонентов (в частности, ионов кальция, связанных с белками плазмы). Пациенту не следует сжимать и разжимать пальцы руки, поскольку это вызывает местный стаз и гипоксию, а также сдвиги в распределении некоторых веществ (холестерина, калия, натрия, кальция и др.) между форменными элементами крови

и ее жидкой частью.

При взятии крови из венозного катетера первые 10 капель крови удаляют. В случае необходимости кровь можно получить из любой вены; у новорожденных можно брать пуповинную кровь. У грудных детей кровь обычно берут из лобной, височной или яремной вены.

На сегодняшний день используются *два основных варианта получения крови* после венопункции:

1. С помощью вакуумных систем взятия крови.
2. Путем аспирации шприцем.

Взятие крови из локтевой вены должно осуществляться иглой с широким просветом в чистую сухую пробирку в количестве 5–6 мл (желательно, при незначительном разрежении). Для забора крови желательно использовать пластиковую посуду: стеклянные пробирки часто несут на поверхности следы детергентов, а также обладают способностью обмениваться ионами с кровью.

Пробирки, бывшие долгое время в употреблении, имеют поврежденную поверхность, при контакте с которой транспортируемой либо центрифугируемой пробы крови повреждаются (травмируются) клеточные элементы, и это может привести к гемолизу эритроцитов. Собранные образцы маркируют в соответствии с принятой в лаборатории системой идентификации образцов (обычно включаемых в ЛИС – лабораторную информационную систему).

Вакуумная технология сбора венозной крови представлена специальными системами, которые, как правило, состоят из трех элементов:

1. Стерильной двусторонней иглы.
2. Держателя пробирки.

3. Пластиковой пробирки с круглым дном и предохранительными заглушками, предотвращающими обратный ток крови и нарушение стерильности. Ток крови прерывается, как только прекращается действие вакуума (рис. 14).

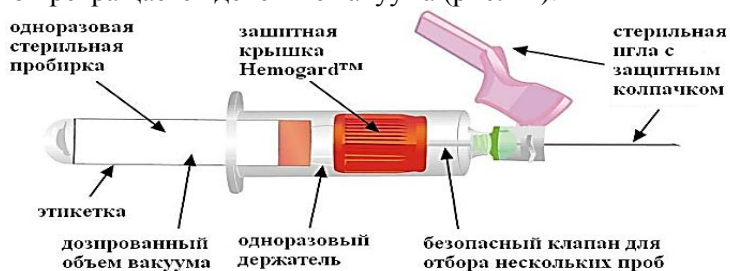


Рис. 14. Одноразовая безопасная закрытая вакуумная система для взятия крови

Вакуумные системы для взятия крови обеспечивают стандартизованное получение венозной крови в гарантированно стерильных условиях, исключает контакт персонала с кровью, обеспечивает визуальный контроль забираемого объема крови.

К тому же, пробирки, в которые берется кровь на исследование, являются одновременно центрифужными, транспортными и емкостями (сосудами) для хранения и пересылки биологического материала в другие лаборатории.

Вакуумные пробирки подразделяются по целевому назначению, будучи предназначены для получения сыворотки, плазмы, цельной крови.

Характеристика пробирок

Пробирки для получения сыворотки рассчитаны на различные объемы крови; они либо не содержат добавок, либо заключают внутри себя добавленные ускорители свертывания крови (в виде различных гранул, стеклянных или силикатных шариков). Для разделения сгустка сыворотки используется также инертный полимерный гель [3].

Для получения плазмы предназначены аналогичные пробирки, но с добавлением различных антикоагулянтов; в зависимости от того, какие компоненты следует определять, они содержат тот или иной антикоагулянт с включением или без включения разделительных гелей и гранул из полистирола.

Пробирки выпускаются как с обычными, так и со специальными крышками (пробками), позволяющими при открывании пробирок полностью исключать контакт оператора (лаборанта) с кровью, которая может находиться в пробке и на внешнем крае пробирки. Крышки пробирок маркированы, сделаны из пластика или резины разных цветов, что помогает медсестре, берущей кровь на исследование, правильно выбрать пробирки, необходимые для выполнения соответствующих видов анализа (табл. 1).

Таблица 1

Основные типы пробирок для закрытой одноразовой вакуумной системы взятия крови

Цветовой код	Химические наполнители, материал	Область применения	Число перемешиваний	Рекомендации по центрифугированию	Дополнительные рекомендации
1	2	3	4	5	6
Красный	Без наполнителя либо с активатором свертывания (кремнезем) Стекло, пластик	Клиническая химия, серология, иммунология	5–6	1300 g 10 мин при t воздуха 20–25 °C	Рекомендуемое минимальное свертывание 60 мин
Голубой	Цитрат натрия 3,8 % - (0,129 г/моль) или (0,109 г/моль) Стекло, пластик	Коагулология: протромбин, тромбопластин фибриноген, факторы свертывания	5–6	2000–2500 g 10–15 мин при t воздуха 20–25 °C	Пробирки должны быть заполнены полностью
Черный	Цитрат натрия 3,8 % - (0,129 г/моль) Стекло, пластик	Определение СОЭ по методу Вестергрена	5–6		Пробирки должны быть заполнены полностью
Лиловый	К2ЭДТА или К3ЭДТА, К2ЭДТА или К3ЭДТА и разделительный гель Стекло, пластик	Гематологические исследования цельной крови, RV, HBs-антиген, ВИЧ	8–10	1300 g 10 мин при t воздуха 20–25 °C	
Серый	Фторид натрия, оксалат натрия,	Исследования глюкозы	6–8	10 мин при t воздуха	

	фторид натрия и ЭДТА			20–25 °С	
Желтый	Активатор свертывания (кремнезем) и разделительный гель	Клиническая химия, серология, иммунология	5–6	1300–2000 g 10 мин при t воздуха 20–25 °С	Рекомендуемое свертывание 20 мин

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6
Оранжевый	Активатор свертывания (кремнезем) и тромбин 1,4 для ускорения свертывания крови Стекло, пластик	Экспресс-диагностика сыворотки в клинической химии, серологии, иммунологии	5–6	1300–1500 g 10 мин при t воздуха 20–25 °С	Рекомендуемое свертывание 5 мин
Зеленый	Литий гепарин, литий гепарин и разделительный гель Стекло, пластик	Исследование плазмы в клинической химии, иммунологии	8–10	1300 g 10 мин при t воздуха 20–25 °С	
Светло-зеленый	Натрий гепарин, натрий гепарин и разделительный гель Стекло, пластик	Исследование плазмы в клинической химии, иммунологии	8–10	1300-2000 g 10 мин При t воздуха 20–25 °С	

Цвет крышки указывает на вид наполнителя и назначение пробирки. В качестве наполнителя используются активаторы свертывания (тромбин, кремнезем), антикоагулянты (ЭДТА, цитрат натрия, литий-гепарин, натрий-гепарин и т.д.), разделительные гели, специальные химические реагенты.

Для обеспечения в пробе точного соотношения крови/антикоагулянт количество наполнителя в пробирках строго соответствует заданному объему крови.

Наряду с этими системами взятия крови, обеспечивающими высокое качество его выполнения, используются и специальные пробирки для взятия капиллярной крови. Защелкивающаяся крышка микропробирки специальной конструкции легко открывается и сводит до минимума могущий возникнуть аэрозольный эффект. Калиевая соль ЭДТА нанесена на нижнюю часть пробирки в виде очень

мелкодисперсного порошка, который мгновенно растворяется при контакте с кровью! (этот эффект достигается благодаря использованию уникальной технологии ультразвукового напыления ЭДТА!).

Широкое использование находят микропробирки конические с интегрированной крышкой типа Эппендорф, выпускаемые объемом 0,5 мл и 1,5 мл. Они представляют собой градуированные микроцентрифужные пробирки объемом 0,5 мл и 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. Изготовлены из полипропилена высокой чистоты, устойчивы к замораживанию. Крышка пробирки легко открывается и закрывается одной рукой, без угрозы разбрызгивания жидкости и образования аэрозоля. Предназначены для хранения, транспортирования и центрифугирования микропроб биологического материала.

Наряду с микропробирками используются и пробирки большего объема для взятия венозной крови (на 1,2, 1,5, 4,0 мл) из полистерала, полипропилена, полиэтилена и др. [2].

Внимание: перед проведением лабораторного гематологического анализа следует плавно перевернуть пробирку 3 раза, открыть крышку, поднести к пробоотборному зонду так, чтобы проба крови отбиралась из среднего объема взятой крови.

Для получения капиллярной крови используются скарификаторы-копья (hem ООО «ГЕМ»), автоматические ланцеты (легкое нажатие при использовании ланцетов гарантирует абсолютно безболезненный прокол), а для отбора полученной цельной крови – полуавтоматические пипетки. Среди них пипетки Ленпипет Лайт (Thermo); 1-, 8-, 12-, 16-канальные электронные пипетки Финпипет Новус (позволяют использовать 10 режимов дозирования, с подсветкой: меню на русском языке) и др.

Для выполнения иммунохимических исследований обычно используют сыворотку, но в ряде случаев, плазму крови.

Технологии получения сыворотки и плазмы крови

Сыворотку (дефибринированную плазму) получают из спонтанно свернувшийся цельной крови. Доставленные в лабораторию пробирки с кровью закрывают ватной пробкой и помещают на 10–15 мин в термостат для прогревания при температуре 37 °С. Затем осторожно проводят пластиковой либо стеклянной палочкой

по внутренней стенке пробирки, чтобы ускорить получение сыворотки. Удерживая сгусток стеклянной палочкой, сыворотку сливают в центрифужную пробирку и центрифугируют. Пробирку с кровью допускается выдерживать при комнатной температуре (20–26 °С)

в течение 1–1,5 часа после взятия, сгусток отделяют от стенки пробирки пластиковой палочкой.

Она не содержит факторов свертывания, за исключением кальция. При получении сыворотки в стеклянных центрифужных пробирках объем ее составляет около 1/3 взятого объема крови. Но при некоторых патологических состояниях он может быть меньшим. В нормальной крови сгусток образуется при комнатной температуре в течение 20–60 мин. *Если не соблюдать указанное время, то может иметь место латентное (запоздалое) свертывание, в результате которого может происходить закупорка проточных элементов лабораторного гематологического анализатора сгустками, что затрудняет пипетирование проб.*

В пробирках из пластика время свертывания крови удлиняется.

Сыворотку желательно использовать для лабораторных исследований в день взятия крови. Если же исследование откладывается до следующего дня, пробирку с сывороткой закрывают пробкой и помещают в домашний холодильник (рефрижератор), в котором хранят при температуре 0–4 °С.

Период времени от момента получения биологической жидкости до начала этапа ее центрифугирования с целью получения сыворотки крови должен составлять не более, чем 1 час; 30–90 мин после взятия из холодильника крови до этапа центрифугирования. Период центрифугирования в пробирках с ускорителем свертывания крови должен составлять 5–15 мин. Взятие сыворотки из пробирки с гелевым барьером допускается не позднее 48 часов после центрифугирования, а из пробирки с негелевым барьером – не позднее чем через 1 час. Если сыворотка или плазма крови не может быть использована в течение 5 часов, то биологическую жидкость следует поместить в холодильник на сутки (24 часа).

Обычно сыворотку крови держат в холодильнике при +4 °С. Допускается ее хранение в течение месяца (и более) *при условии*

замораживания сразу после получения и однократном размораживании непосредственно перед определением.

Если же данные об устойчивости определяемых соединений, в частности об изменении активности фермента в сыворотке (плазме) крови при хранении, отсутствуют, рекомендуется проводить лабораторный анализ тотчас после ее взятия. Для определения содержания лабильных (нестойких) соединений, активности некоторых ферментов (кислой фосфатазы и др.) необходимо пользоваться свежей или лиофилизированной сывороткой.

Плазму получают из крови путем отделения ее клеток центрифугированием пробы крови; в противоположность сыворотке она содержит факторы свертывания.

Для получения плазмы рекомендуется центрифугирование в пробирках с антикоагулянтом немедленно после взятия крови.

Если требуется получить плазму, в пробирку заранее вносят соответствующий антикоагулянт (цитрат натрия, оксалат натрия или калия и др.) для предохранения крови от свертывания. Кровь с антикоагулянтом осторожно перемешивают (без вспенивания), закрывают пробирку (в практике деятельности сотрудников КДЛ устоялся прием закрытия пробирок кусочком полиэтиленовой пленки)

и оставляют в штативе на 20–25 мин. Интенсивное встряхивание вызывает гемолиз эритроцитов, что искажает параметры коагулограммы: плазма с признаками гемолиза не пригодна для исследования.

При взятии крови для получения плазмы важен правильный выбор необходимого антикоагулянта. Наиболее часто используют трикалиевую или динатриевую соли ЭДТА, тринатрийцитрат и гепарин. ЭДТА и тринатрий-цитрат ингибирует коагуляцию путем удаления кальция из крови. Несоответствие концентрации коагулянта объему взятой в пробирку крови и недостаточно тщательное смешивание могут привести к значительным ошибкам.

Период хранения пробы составляет до 6 часов при температуре 18–25 °С.

Преимуществами плазмы крови по сравнению с сывороткой являются:

1. Меньшая опасность возникновения гемолиза.

2. Большой «выход» жидкой части крови при центрифугировании (на 10–20 % по сравнению с сывороткой), а при использовании коммерческих пробирок с антикоагулянтом – на 30–40 %, что особенно важно в педиатрии при исследовании ослабленных больных и пожилых людей.

3. Более быстрое получение материала для исследования в связи с исключением этапа образования сгустка. Это особенно важно при выполнении срочных анализов.

4. Исключение потери части метаболитов, вызываемой их разрушением в период инкубации для получения сгустка.

В последнее время применяют пробирки, специально предназначенные для получения как сыворотки, так и плазмы.

При *исследовании системы гемостаза* к процессу взятия крови предъявляют ряд дополнительных требований. Так, рекомендуется использовать иглу с широким просветом, однако лучше всего взятие крови осуществлять без шприца (его применяют лишь для взятия крови у детей, а также у взрослых больных с явлениями гипотензии либо находящихся в терминальном состоянии; при этом шприц должен быть полиэтиленовым или силиконированным).

Дезинфекцию кожи осуществляют обработкой соответствующего ее участка над местом прокола (обычно в локтевом сгибе) тампоном, смоченным 70 % этиловым спиртом. Поскольку при прохождении иглы через кожу в просвет иглы перемещаются тканевая жидкость и фрагменты тканей, которые в дальнейшем могут существенно повлиять на показатели системы свертывания крови, первые (после наложения жгута и прокола вены иглой) 0,5–1,0 мл крови нельзя использовать для постановки коагулограммы. Кровь должна стекать по стенке пробирки (целесообразно использовать специальные пробирки для взятия крови).

В случае возникновения гемолиза, который определяется как «высвобождение компонентов клеток крови (гемоглобина и др.) в плазму/сыворотку» и характеризуется более или менее выраженным красноватым окрашиванием плазмы/сыворотки; *гемолизированные пробы не должны учитываться* либо подвергаться лабораторному исследованию. Гемолиз можно предупредить путем стандартизации преаналитического этапа.

Гемолизированные сыворотку и плазму не рекомендуется использовать для анализа, за исключением редких случаев.

Транспортировка образцов сыворотки, плазмы и цельной крови

Влияние времени и температуры хранения пробы на результат лабораторного исследования.

Полученная кровь должна быть своевременно доставлена в лабораторию. Согласно рекомендациям производителей иммуноферментных и других тест-систем, необходимо не позже чем через 1 час после взятия крови отобрать из нее сыворотку. Полученный биоматериал (кровь) не рекомендуется хранить более 12 часов при комнатной температуре и более 1 суток при 4–8 °С. Происходящий в этом интервале времени гемолиз может повлиять на результаты анализа.

Рекомендации по условиям хранения и транспортировки биологического материала для выполнения иммунологических и биохимических исследований:

1. Избегать хранения цельной крови: быстрая транспортировка и короткий срок хранения повышают достоверность результатов лабораторных исследований крови.

2. Сохранять образцы биологической жидкости при как можно более низкой температуре: чем ниже температура их хранения, тем дольше и лучше сохраняются образцы проб.

3. Хранить аликвоты анализируемых биологических жидкостей в закрытых сосудах (чтобы избежать испарения и контаминации).

4. По возможности шире использовать одноразовые системы для сбора проб.

5. Использовать пробирки с разделительными гелями для более эффективного отделения сыворотки от сгустка.

6. Избегать встряхивания сосуда с пробами крови, поскольку при этом риск гемолиза увеличивается (это во многом касается негативного влияния использования технологии пневматической доставки пробирок в лабораторию).

7. Всегда хранить сосуды с кровью в вертикальном положении.

8. Избегать воздействия света на пробы биологических жидкостей.

9. С особой осторожностью обращаться с инфицированным биологическим материалом.

Другие факторы, ведущие к внелабораторным ошибкам

Внелабораторные доаналитические ошибки во многом могут быть обусловлены рядом иных причин, среди которых:

- суточные и сезонные колебания концентрации метаболитов в биологических жидкостях (крови, моче и др.);
- индивидуальные, возрастные, половые особенности пациентов;
- характер питания, эмоциональная лабильность, во многом зависящая от индивидуального состояния вегетативной нервной системы пациента;
- влияние стресса, физической активности, послеоперационного состояния, постельного режима, беременности, а также *неправильной подготовкой пациента к лабораторным исследованиям*: не натощак, проведение лечебно-диагностического вмешательства накануне взятия крови и др.

Таким образом, на результаты лабораторного исследования влияют как возраст, раса, пол, беременность, так и *изменение физического состояния пациента*, обусловленное диетой, голоданием, физическими упражнениями, подъемом на большую высоту над уровнем моря, приемом психоактивных и лекарственных веществ, курением, употреблением алкоголя.

Следует учитывать и влияние на состояние обменных процессов циркадного ритма и фаз менструального цикла.

К внелабораторным ошибкам определения приводит также *прием пациентами лекарственных веществ*, которые способны: изменять интенсивность патологического процесса (1), оказать побочное действие на функцию различных органов и систем (2), вызывать общий токсический эффект при передозировке или вследствие кумулятивного действия препарата (3), интерферировать (взаимодействовать) с определяемым веществом в процессе лабораторного исследования (4).

Морфологический состав крови также подвержен более или менее выраженному влиянию многих лекарственных средств, в том

числе анальгетиков, сульфаниламидов, нейромиметиков, депрессантов, антибиотиков широкого спектра действия и других.

Среди внелабораторных (доаналитических) ошибок выделяют не только те из них, которые связаны с состоянием пациента (на которое влияет прием в большом количестве лекарственных препаратов, алкоголя, курение, взятие крови не натощак, стресс и волнение, физическая нагрузка и т.п.), но также *ошибки взятия проб* (гемолиз пробы, недостаточно отмытые («грязные») и влажные пробирки, *длительное хранение* биологического материала до доставки в лабораторию) и «канцелярские» ошибки (дефекты оформления документации), вызванные, в частности, перепутыванием фамилий пациентов и их кодирующих номеров, бланков-заказов и другими причинами.

Необходимо следить за тем, чтобы правильно была осуществлена маркировка проб (с указанием фамилии и инициалов пациента, времени взятия крови и т.д.): несоблюдение этого правила приводит к существенным ошибкам в определении показателей лабораторных тестов, относящихся к конкретному пациенту.

Мутность пробы всегда должна быть оценена, документирована и отмечена в бланке лабораторного анализа. Гомогенная мутность может указывать на гипертриацилглицеринемию, сопровождаемую повышенным содержанием ЛПОНП. Отчетливый сливкообразный слой, плавающий над прозрачным слоем биологической жидкости после центрифугирования и хранения свыше 12 часов в холодильнике, указывает на наличие хиломикронов (ХМ).

ПОГРЕШНОСТИ, ДОПУСКАЕМЫЕ НА ЛАБОРАТОРНОМ ЭТАПЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ошибки лабораторного этапа могут возникать на доприборном и инструментальном (аналитическом) периодах его выполнения.

Результаты лабораторного анализа во многом зависят от того, насколько правильно соблюдаются необходимые требования к подготовке проб биологической жидкости, подготовки проб к исследованию и хранению образцов [4, 5, 6, 7, 8]. Так, для выполнения некоторых тестов требуется соблюдение специальных условий сбо-

ра

и хранения проб (например, в случае определения газов крови пробы должны быть направлены в лабораторию «на льду», что предотвращает возникновение ошибок в процессе исследования).

Задержка с доставкой в лабораторию исследуемого биологического материала также может привести к получению ложных результатов (например, снижению уровня глюкозы за счет продолжающихся в крови процессов метаболизма).

Доприборная часть лабораторного этапа – пробоподготовка начинается с момента доставки в лабораторию образца биологического материала вместе с информацией (заявкой) на его исследование и включает в себя: организацию приема и регистрацию проб и заявок на выполнение исследований, отбраковку проб, не пригодных для анализа, и хранение проб до выполнения лабораторных исследований, распределение проб по видам лабораторного анализа, заполнение рабочих штативов и картирование (т.е. расположение образцов на микропланшете в случае выполнения методом иммуноферментного анализа).

Пробоподготовка является первым этапом, который осуществляется непосредственно в лаборатории. Для создания надлежащих условий при центрифугировании следует ориентироваться не на угловую скорость вращения ротора центрифуги (в об/мин), а на центростремительное ускорение (которое во многом определяется радиусом ротора центрифуги).

Другим источником ошибок на этапе пробоподготовки является «*аликвотирование проб*» – разлив биологической жидкости (сыворотки крови) из первичной пробирки в одну или несколько вторичных. Полная стандартизация этого этапа возможна только при наличии в лаборатории анализаторов, работающих с первичными пробирками.

Критерии выбраковки биологического материала на исследование должны быть определены заранее и зафиксированы в документах. *Низкое качество образцов характеризуется такими критериями*, как превышение срока доставки, наличие сгустков в плазме или сыворотке крови, гемолиз, желтушность, высокое содержание липидов, мутность пробы.

Присутствующие в образцах биологической жидкости частицы фибрина, микросгустков, их бактериальная контаминация,

проявления гемолиза, хилезный характер проб – могут давать ложноположительные результаты.

Образцы крови и ее компоненты могут храниться при 2–8 °С в течение времени, указанного в инструкции по выполнению анализа. Чем больше срок хранения образца, тем ниже должна быть температура хранения. Для хранения образцов при -70 °С рекомендуется использовать *специальные криопробирки*, что позволяет избежать вымораживания образцов. *Следует избегать многократного замораживания и оттаивания проб.*

Очень частым источником ошибки является недостаточное перемешивание глубокомороженных проб после их оттаивания. После оттаивания пробирку с пробой следует перемешать несколько раз (можно перемешивать с помощью вортекса), избегая при этом образования пены.

Хранить пробы (либо их дубликаты) после проведения анализа нужно таким образом, чтобы в случае необходимости можно было подтвердить ранее полученные результаты и, если необходимо, провести дополнительные тесты по медицинским или правовым показаниям.

Влияние условий организации деятельности клинико-диагностических лабораторий на качество выполнения аналитических исследований

Требования к клинико-диагностической лаборатории (КДЛ) в отношении создания оптимальных условий для выполнения ИФА.

КДЛ должна представлять собой хорошо приспособленное, достаточно освещенное помещение, в котором следует поддерживать постоянство температуры и влажности. Слишком сухой воздух приводит к проявлению краевых эффектов на планшете вследствие неравномерного испарения содержимого лунок. К тому же, повышение температуры приводит к увеличению скоростей всех реакций. Реакции в ИФА должны происходить при температуре 18–25 °С.

Наилучшим способом решения проблемы поддержания в помещении необходимой температуры является размещение в лаборатории кондиционера.

Каждый образец биологического материала должен быть пронумерован. Все процедуры с образцом должны быть изложены в протоколе исследования, в котором отражены: наименование тест-системы, серия, способ оценки результатов, наличие контрольного теста.

Следует вести журнал регистрации температуры в лаборатории, температуры в холодильниках и термостатах.

Условия работы с лиофилизированными контрольными образцами.

Типичными ошибками, возникающими при манипуляции с лиофилизированными контрольными образцами являются:

- внесение неточной дозы растворителя;
- потеря вещества лиофилизированной пробы при небрежном скрытии флаконов;
- несоблюдение временного интервала при растворении лиофилизированной сыворотки;
- сильное встряхивание или перегревание флакона при растворении сыворотки;
- несоблюдение условий хранения растворенного контрольного материала;
- разведение лиофилизированных компонентов набора не соответствующей жидкостью, имеющей комнатную температуру: пробы сыворотки разводят только тем раствором, который предусмотрен инструкцией, присутствует в наборе или дано четкое описание его приготовления. Использование других растворов не допустимо, так как вызывает реструктуризацию матрикса образцов и приводит к неправильному результату анализа.

Требования, предъявляемые к использованию наборов реагентов.

Лаборатория ИФА должна проводить входной контроль каждой серии тест-системы, поступившей от производителя. При входном контроле необходимо проверить комплектацию наборов, соответствие физико-химических свойств ингредиентов набора инструкции по применению и паспорту на тест-систему.

При проведении ИФА необходимо строго следовать инструкции по применению тест-системы. Любое отклонение от нее может вызвать ошибку и оказать большое влияние на проведение всего анализа.

Опыт работы показал, что к наиболее распространенным «со- знательным» нарушениям инструкции относятся:

1. Сокращение времени инкубации с субстратной смесью и ТМБ (либо ОФД), в результате происходит снижение чувствительности тест, вследствие чего пропускаются сыворотки с невысоким показателем теста.

2. Изменение условий выполнения и количества промывок. Необходимо полностью заполнять лунки планшета промывающим раствором с помощью промывающего устройства. (Внимание: осуществлять промывку с помощью ручного дозатора не рекомендуется – отсутствует давление жидкости и возрастает угроза ее разбрызгивания).

3. Изменение времени, температуры и условий проведения инкубации сывороток.

4. Внесение самостоятельных решений в условия инкубации недопустимо. Если в инструкции указано «закрыть крышкой», то нельзя заклеивать планшеты клейкой лентой: это ведет к «пятнистому» эффекту на планшете (ложноположительные результаты).

5. Нарушение последовательности внесения реагентов.

6. Смешивание реагентов разных серий. При работе нужно использовать только те компоненты, которые входят в набор одной серии.

Иммунохимические исследования выполняются как с плазмой, так и с сывороткой крови. Основным биологическим материалом для определения содержания метаболитов является *сыворотка крови*. При этом следует иметь виду, что при разрушении (лизисе) эритроцитов находящиеся в них ферменты переходят в сыворотку крови. Этим объясняется, в частности, более высокая активность энзимов (лактатдегидрогеназы, аланин-, аспаратамино-трансферазы, фруктозодифосфатальдолазы, кислой фосфатазы, аргиназы, фосфогексоизомеразы и других ферментов, содержащихся в тромбоцитах и эритроцитах и освобождающихся из них при свертывании крови) в сыворотке, чем в плазме крови. Поэтому для оценки активности перечисленных и некоторых других ферментов рекомендуется использовать не сыворотку, а плазму крови.

Содержание электролитов правильнее определять в плазме крови (при соответствующем подборе антикоагулянта). Поскольку

концентрация ионов калия в эритроцитах намного превышает уровень этого катиона в плазме крови, они могут выходить из эритроцитов даже через неповрежденную оболочку (что обуславливается нарушениями метаболических процессов в плазматической мембране клетки), в частности.

Биологический материал, как правило, сохраняют до окончания выполнения всех анализов, что позволяет в случае необходимости повторить определение.

Внутрилабораторные ошибки

Могут быть объективными и субъективными.

Объективные ошибки часто связаны с некачественным стандартом, неправильным его приготовлением, неправильной калибровкой прибора, неправильными расчетами. Такие ошибки часто возникают при несоблюдении сроков хранения и неправильном приготовлении, и загрязнении реагентов. *К объективным ошибкам* может привести также состояние измерительной аппаратуры и ее энергообеспечение: такие ошибки зависят от метода и техники исследования.

Субъективные ошибки – это ошибки, непосредственно связанные с квалификацией исполнителей. Исследование необходимо выполнять строго по инструкции, соблюдать все этапы с особой тщательностью. Приступать к измерениям на приборах следует только после изучения устройства прибора и правил по его эксплуатации. Пробирки и измерительные кюветы должны быть чистыми и сухими.

При выполнении исследования вручную большой процент ошибок связан с пипетированием, при этом работники клинико-диагностических лабораторий нередко допускают индивидуальные ошибки при взятии как биологического материала, так и реагентов. Несоблюдение этих условий обуславливает интегральную ошибку, отражающую неточность конечного результата.

Молекулярно-биологические факторы погрешностей аналитического этапа выполнения иммунохимического исследования

К ним относятся погрешности, возникающие по причине влияния гетерофильных антител на протекание иммунохимической реакции.

Гетерофильные антитела, будучи эндогенными, способны вступать во взаимодействие с эпитопами молекул антигенов разной природы. Как правило, они являются низкоспецифичными.

Гетерофильные антитела способны оказывать влияние на результаты как конкурентных, так и неконкурентных иммунологических исследований. В основе взаимодействия могут лежать разные механизмы, приводящие к ложноположительным и ложноотрицательным результатам. Гетерофильные антитела способны связываться с конъюгатом, ферментом либо другой частью диагностических антител. Возможная схема получения ложноположительных результатов представлена на рис. 15 [8].

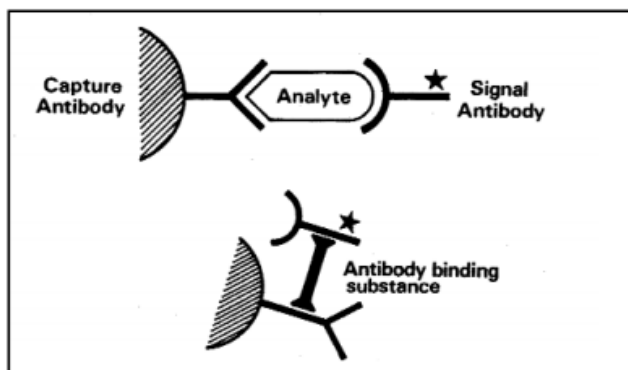


Рис. 15. Схема получения ложноположительных результатов, вызванных гетерофильными антителами

Гетерофильные антитела выступают связывающим звеном между фиксированными и сигнальными антителами в результате чего возникает сигнал без присутствия специфических антител и как следствие – ложноположительный результат для пациента.

Установлено, что по указанной схеме осуществляется влияние ревматоидного фактора на результаты определения альфа-фетопротеина методом хемилюминесцентного анализа (что привело к ложноположительным результатам).

Таким образом, интерференция в иммунологическом анализе выступает в роли одного из факторов, способных снижать точность лабораторного тестирования вследствие протекания перекрестных реакций.

Весьма часто встречающейся причиной возникновения ложноположительного результата в ходе диагностики инфекционных заболеваний является наличие в крови пациентов неспецифических антител, перекрестно реагирующих с вирусоспецифическим антигеном. К тому же, при ряде состояний – системных заболеваний соединительной ткани, некоторых опухолях, ревматизме, а также при беременности происходит изменение соотношения белковых фракций крови, образуются неспецифические антитела, которые могут связываться в ИФА и давать ложноположительные результаты.

Сходную ложноположительную реакцию может давать материал планшета. Несмотря на то, что изготовители тест-систем для устранения неспецифических результатов создают специальные блокирующие растворы, бороться с этим явлением достаточно сложно. Поэтому при сложных диагностических ситуациях целесообразно проводить дополнительные исследования на тест-системе другого принципа исследования, другого вида производства диагностических белков (синтетические пептиды, рекомбинантные антигены). Следует также использовать подтверждающие тесты, проводить титрование сыворотки [8].

Основные причины и условия возникновения погрешностей, сказывающихся на выполнении аналитического этапа иммуноферментных исследований

Согласно данным литературы [4, 5, 6, 7, 8], таковыми являются:

1. Влияние отличающейся от комнатной температуры на ход иммунохимической реакции: поэтому важно поддерживать температуру помещения в пределах 18–25 °С. Изменение температуры в сторону снижения либо повышения не только влияет на ход реакции, обычно сопровождаемой развитием окраски, но и, в ряде ситуаций, на физическую характеристику иммуносорбента (в том числе вследствие его высыхания при повышенной температуре).

Для устранения влияния этих нежелательных факторов целесообразно проведение инкубации в термостате (желательно, водяном), установленном на комнатную температуру (18–25 °С), если в помещении холодно, либо слишком жарко. При отсутствии такой возможности будет правильно отказаться от выполнения исследования при более высокой, либо более низкой температуре.

В силу указанных причин компоненты набора реагентов и вспомогательные реактивы должны быть предварительно прогреты до комнатной температуры. Внесение в лунки холодных растворов при осуществлении «короткой» (во времени) инкубации может существенно исказить результаты исследования.

2. Нарушение требований эксплуатации наборов реагентов для иммунохимического исследования.

К возникновению погрешностей может привести длительное стояние открытых флаконов – как вследствие абсорбции влаги, так и испарения находящейся в них жидкости.

При длительном открытии лунок планшетов находящиеся в них лиофилизированные (сухие) препараты могут подвергаться порче из-за конденсации на них влаги.

Поскольку основной причиной нарушения качества, связанного с внутренней поверхностью ячеек лунок иммуносорбента, является влияние влаги, то не использованные открытые стрипы разборных планшетов следует заклеивать липкой бумагой (!): при отсутствии таковой возможности предпочтительнее отказаться от выполнения исследования при более высокой, чем комнатная, температуре.

3. Имеет значение и *качество воды* и других растворителей, которое определяется прежде всего значением ее рН (так, вода с рН 4,0 может вызвать десорбцию иммобилизованных антител и антигенов). Следует иметь в виду, что при разведении концентрированных и лиофилизированных компонентов набора реагентов следует использовать только свежеприготовленную дистиллированную (либо деионизованную) воду, так как при хранении воды может произойти сдвиг рН и появиться бактериальный рост [6]. Периодически (каждые

3 суток) следует промывать емкость для накопления очищенной воды 3 % (30 г/л) перекисью водорода и тщательно споласкивать ее очищенной водой. Не допускается хранить воду в алюминиевых

или оцинкованных емкостях, а также добавлять в нее консерванты (ингибиторы пероксидазы хрена и других ферментов). Температура используемой в ИФА воды должна составлять 18–22 °С.

4. Важно соблюдение требуемых условий вентиляции, принимая во внимание то обстоятельство, что в составе реагентов для ИФА находятся агрессивные реагенты, не безопасные для состояния здоровья человека.

5. Лабораторная посуда должна быть тщательно обработана и полностью освобождена от следов моющих средств.

6. Условием подготовки к исследованию замороженных проб является оттаивание их при комнатной температуре при последующем тщательном перемешивании на смесителе типа «вортекс».

7. Использование нестандартизованного (не прошедшего метрологической поверки) лабораторного оборудования на доаналитическом и аналитическом этапах, нередко приводящее к систематическим ошибкам. Так, допустимая погрешность автоматических и полуавтоматических пипеток (дозаторов) не должна превышать 5 %: неправильное дозирование растворов при проведении микроанализа особенно неблагоприятно сказывается на полученных результатах (существует рекомендация не реже одного раза в месяц проводить проверку работы дозаторов на точность и сходимости результатов пипетирования весовым методом).

Другие погрешности, возникающие при выполнении отдельных мануальных процедур технического исполнения иммуноферментного метода исследования:

– повреждение (подсушивание) иммуносорбента вследствие создания чрезмерно сильного вакуума при аспирации содержимого лунок. К искажению приводит и неполное удаление отмывочного раствора, капли которого могут быть удалены постукиванием по перевернутой поверхности планшет, размещенных на сменной полоске фильтровальной бумаги;

– проведение инкубации с раствором субстрата (ГМБ, ОФД) на свету: вызывает «краевые эффекты» на планшете, для чего требуется осуществлять инкубацию в темноте.

8. Нарушение подачи или аспирации растворов вследствие засорения внутреннего канала промывающего устройства: при этом происходит частичный перенос реагентов из одной лунки планшета

в другую, что приводит к повышению оптической плотности раствора в ячейках планшета и возникновение систематической ошибки.

Отсюда следует, что необходимо ежедневно визуально контролировать качество (однородность) заполнения лунок и удаления растворов. По завершении работы требуется тщательно промыть устройство дистиллированной водой.

9. Одной из распространенных причин получения неправильных результатов является процедура *измерения оптической плотности*.

Важно использовать одну и ту же регламентированную длину волны фотометрического измерения; желательно использовать один и тот же прибор (спектрофотометр, иммуноферментный автоанализатор).

Изменение оптической плотности реакционной смеси может быть вызвано артефактами: наличием капель, царапин, отпечатков пальцев и других загрязнений на дне лунок планшетов. В таких ситуациях следует аккуратно протереть его мягкой сухой безворсовой салфеткой.

Для получения адекватных результатов следует использовать только тот светофильтр, который обеспечивает необходимую длину волны считывания, так как ее изменение приводит к резкому изменению регистрируемой оптической плотности.

На заключительном этапе исследования требуется в положенный срок – не позднее 15 мин после внесения стоп-реагента проводить измерение оптической плотности: по истечении этого срока оптическая плотность в лунках продолжает возрастать.

10. Важным условием достижения стандартизации процедур выполнения аналитического исследования является режим постоянного встряхивания планшетов. Но при слишком интенсивном встряхивании может происходить десорбция иммобилизованных на планшете реагентов, а также выплескивание растворов из лунок, тогда как при недостаточном перемешивании возможно снижение оптической плотности и получение ложных результатов.

Исходя из того, что при недостаточной интенсивности встряхивания реакционной смеси возможно получение неудовлетворительных результатов, по мнению экспертов предприятия «ХЕМА» [3, 4], предпочтение следует отдавать наборам реагентов, которые в

основном не требуют применения шейкеров. При использовании этих тест-систем инкубация проводится без встряхивания при комнатной температуре или при 37 °С в термостате.

11. Следует иметь в виду возможное влияние на полученные результаты конструктивных особенностей иммуноферментных анализаторов. Иммуноферментные анализаторы некоторых типов не способны обеспечить одинаковую продолжительность инкубации для всех лунок планшета: иногда разница во времени внесения компонентов в первую и последнюю лунку может достигать 18 мин, что неизбежно снижает качество лабораторного исследования.

12. Необходимы проведение постоянно действующей внутрилабораторной системы контроля качества выполнения исследования,

а также участие лаборатории в системе внутреннего и внешнего контроля качества анализов.

ПОГРЕШНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ, ВЛЕКУЩИЕ ИСКАЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗАТОРА

Ошибки, допускаемые в ходе выполнения ИФА по технологии ELISA.

Причины появления ложноположительных и ложноотрицательных результатов, вызванных погрешностями в техническом исполнении иммуноферментного метода исследования ELISA [4, 5, 6, 7, 8]:

1. Заниженная интенсивность окрашивания (оптическая плотность) содержимого лунок планшета (предупреждение возникновения и устранение):

– уменьшение времени инкубации с конъюгатом и/или субстратной смесью (следовать указаниям текста инструкции к набору реагентов);

– применение перед использованием не прогретых до комнатной температуры компонентов набора и/или исследуемых образцов (выдерживать в течение получаса при комнатной температуре);

– не соблюдение температурного режима при хранении набо-

ра (хранить в холодильнике при 2–8 °С);

- заниженный температурный режим при инкубациях в термостате/шейкере (систематически проверять температуру в термостате и шейкере);

- недостаточно полная аспирация после отмывки: на дне лунок имеются остатки промывающего раствора (обратить внимание на качество работы промывочного устройства);

- длительное нахождение планшета на воздухе между этапами реакции, излишнее высыхание лунок (быстро производить внесение растворов из заранее подготовленных компонентов);

- использование реагентов из других наборов или другой серии;

- истечение срока годности компонентов;

- низкая температура воздуха в лаборатории (ниже 20 °С);

- ошибки в работе спектрофотометра.

2. Чрезмерная интенсивность окрашивания (оптическая плотность) содержимого лунок планшета (предупреждение возникновения и устранение):

- уменьшенное количество вносимого в лунки промывающего раствора. Не промывание верхней части лунок. (проверить установку программы промывочного устройства);

- недостаточно полная аспирация после отмывки: на дне лунки имеются остатки промывающего раствора (проверить установку программы промывочного устройства);

- неравномерная отмывка отдельных рядов лунок планшетов (проверить проходимость раскапывающей и аспирирующей гребенок промывочного устройства);

- загрязнение субстратной смеси вследствие использования многоразовой емкости или воздействия прямых солнечных лучей (использовать одноразовые емкости либо тщательно вымытые емкости и исключить воздействие прямых солнечных лучей);

- увеличение времени инкубации с субстратной смесью или конъюгатом (следовать указаниям инструкции по применению);

- температура в лаборатории выше 30 °С (использовать охлаждающее кондиционирование воздуха).

3. Низкая воспроизводимость результатов измерений:

- сбоем в работе промывающего устройства;

- ошибками при внесении исследуемых образцов и реагентов;
- недостаточным перемешиванием образцов, реагентов или содержимого лунок планшета;
- повреждением поверхности лунки наконечником;
- пузырьками воздуха в лунках;
- увеличением оптической плотности по краю планшета вследствие неравномерного нагревания или инкубации с субстратным раствором на свету;
- использованием дозаторов, не прошедших калибровку и поверку;
- неправильной техникой пипетирования;
- длительным нахождением планшета на воздухе между этапами реакции, излишнее высыхание лунок;
- компонентами набора и/или исследуемые образцы перед использованием не прогреты до комнатной температуры.

4. Полное отсутствие окраски в ходе проведения реакции:

- может быть обусловлено: не внесением в реакционную смесь конъюгата, раствора субстрата (ТМБ и ОФД) либо перепутыванием реагентов.

ОСНОВНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ СОВЕТЫ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ИФА

1. Необходимо составить (с учетом рекомендаций производителя диагностикума) схему расположения на бланке карты серодиагностики стандартов, контролей и образцов на планшете и внести информацию о наименовании диагностического реагента, его серии производства, сроке годности и дате проведения анализа.

2. Убедиться в том, что все необходимые реагенты нагрелись до комнатной температуры.

3. Для разведения концентрата моющего рабочего раствора рекомендовано использовать свежеприготовленную (до 3–4 суток) дистиллированную либо деионизованную воду.

4. При ошибке на этапе внесения в планшет анализируемых образцов данная конкретная лунка должна быть освобождена от исследуемого биоматериала и *зобракована*. Категорически не допускается промывка ячейки и повторное внесение другого образца.

5. Контрольные материалы и каждый из исследуемых образцов следует вносить, используя *новый наконечник* для дозирующего устройства. При наличии возможности предпочтительно анализировать образцы в дублях.

6. Особое внимание следует обращать на точность дозирования. Чтобы свести к минимуму возможные вариации из-за разного времени инкубации образцы нужно вносить последовательно, без временных перерывов, без разбрызгивания биоматериала, придерживая дозатор пальцем второй руки и стараясь при не касаться дна и стенок ячеек микропланшета.

7. Отмывку планшета (количество циклов промывки и объем вносимого моющего раствора) проводить в соответствии с рекомендациями производителя, визуально контролировать наличие остаточного количества жидкости в лунках с целью выявления засорения моющих каналов промываемого устройства.

8. В случае применения моногочанальных дозаторов для внесения растворов конъюгата, субстрата и стоп-реагента обязательно использование одноразовых либо отдельных (*тщательно вымытых*) многоразовых емкостей для каждой из вышеуказанных жидкостей. После окончания проведения анализа многоразовые кюветы подлежат тщательной отмывке с использованием моющих средств, ополаскиванию дистиллированной водой и высушиванию.

9. Установку наконечников в дозирующее устройство (как и проведение всех этапов ИФА) необходимо производить в новых (неопудренных тальком) перчатках, избегая касания кончиков наконечников, погружаемых в рабочие растворы и исследуемые образцы.

10. При термостатировании планшета необходимо накрывать его соответствующей пластмассовой крышкой либо заклеивать листом клейкой пленки.

11. На стадии инкубации с субстратным раствором планшет надо обязательно поместить в темное место и периодически контролировать появление окраски в ячейках в течение регламентированного инструкцией по применению периода времени.

12. После использования всех необходимых реагентов остатки диагностикума незамедлительно поместить для хранения при температуре от +2 до +8 °С.

13. Оставшуюся часть диагностикума использовать после вскрытия в течение регламентированного производителем периода времени.

14. При учете результатов ИФА-анализа на спектрофотометре использовать длины волн, регламентированные производителем диагностического набора.

15. После получения результатов спектрофотометрии на экране анализатора либо при распечатке в бумажном варианте, целесообразно сверить интенсивность зафиксированной окраски с реальной окраской в лунках микропланшета. В ряде случаев может быть возникновение недостоверных результатов при загрязнении отдельных оптических каналов спектрофотометра.

16. При возникновении аварийной ситуации с неисправностью фотометра (либо проблем с электропитанием) непосредственно перед проведением фотометрии, рекомендовано в *экстренных случаях* заморозить планшеты при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Последующее размораживание и фотометрия планшетов после устранения неисправности прибора позволит получить *предварительные ориентировочные* результаты до проведения обязательного повторного ретестирования образцов.

17. С целью предотвращения выхода из строя оборудования в результате электросетевых нарушений рекомендуется подключить приборы к ИБП (источникам бесперебойного питания).

ДЕЗИНФЕКЦИЯ И УТИЛИЗАЦИЯ ИЗДЕЛИЙ ЛАБОРАТОРНОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ПОСТАНАЛИТИЧЕСКОМ ЭТАПЕ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для очистки и дезинфекции поверхностей изделий лабораторного назначения используется ряд эффективных препаратов, созданных, в том числе, на базе отечественных предприятий.

Так, «Научно-производственным центром ХИММЕДСИНТЕЗ» (Республика Беларусь) разработаны дезинфицирующие (на основе пероксида) средства в целях дезинфекции поверхностей, инструментов и оборудования – *Кристаллин-Пералин, Кристаллин-Перолюкс, Перосан*, а также препарат для гигиенической обработки кожи рук персонала – *Персепт*.

Одноразовые вакуумные системы для взятия крови, используемые в учреждениях здравоохранения, после проведения процедур относятся к категории медицинских отходов, потенциально опасных

в отношении возникновения и распространения инфекционных заболеваний, передаваемых с кровью; они являются медицинскими отходами класса Б (опасные отходы) или В (чрезвычайно опасные отходы).

Мероприятия по обеззараживанию и утилизации одноразовых вакуумных систем для взятия крови (и игл для инъекций) должны проводиться в соответствии с действующими нормативными правовыми актами, по вирулицидному режиму.

После взятия пробы иглу, не вынимая из держателя и не надевая на нее защитный колпачок, которым она была закрыта до начала процедуры, следует сбросить в контейнер для использованных острых предметов класса Б или В. Химический метод дезинфекции игл вакуумной системы для взятия крови не применяется, так как нет безопасного способа заполнения канала иглы дезинфицирующим раствором.

При использовании многоразовых держателей они отсоединяются от иглы с помощью иглосъемника либо путем фиксации иглы в специальном отверстии крышки контейнера. В этом случае игла откручивается от держателя, оставаясь в контейнере.

В целях безопасности запрещается разбирать иглу и держатель руками. Контейнеры с иглами утилизируются, а держатели подвергаются обеззараживанию химическим методом согласно требованиям действующих нормативных правовых актов.

Поскольку повторное использование держателя требует отсоединения потенциально контаминированной иглы, медицинский персонал, проводящий манипуляцию, подвергается риску случайного укола и заражения гемоконтактными инфекциями. Вследствие этого в целях безопасности многоразовое применение держателей рекомендуется исключить.

Для обеззараживания вакуумных пробирок после окончания исследований следует отдавать предпочтение физическому методу.

При использовании физического метода обеззараживания вакуумные пробирки с оставшимся в них содержимым герметично

закрывают пробками или крышками, с которыми они поставлялись, собирают в устойчивые к вытеканию жидкостей емкости (контейнеры, пластиковые пакеты), пригодные для физического метода обеззараживания. Контейнеры с отходами обеззараживают и удаляют в места временного хранения отходов для последующего вывоза и утилизации.

Одноразовая тара для сбора опасных отходов (безопасные контейнеры, одноразовые пакеты) должна отвечать медико-техническим требованиям к данной продукции и иметь свидетельство о государственной регистрации, разрешающее ее применение в медицинской практике.

Медицинскому персоналу, осуществляющему сбор, обеззараживание, временное хранение, транспортирование медицинских отходов, категорически запрещается:

- пересыпать собранные детали одноразовых вакуумных систем для взятия крови из одной тары в другую;

- размещать емкости для сбора деталей одноразовых вакуумных систем для взятия крови вблизи электронагревательных приборов;

- утрамбовывать руками использованные детали одноразовых вакуумных систем для взятия крови;

- осуществлять сбор медицинских отходов, в том числе деталей одноразовых вакуумных систем для взятия крови, без резиновых перчаток и санитарной одежды.

Персонал, занимающийся обеззараживанием, сбором и транспортированием использованных деталей одноразовых вакуумных систем для взятия крови, должен быть обеспечен санитарной одеждой (халатами, шапочками или косынками, масками, сменной обувью) и средствами индивидуальной защиты (респираторами, резиновыми перчатками, герметичными очками, непромокаемыми фартуками), которые применяют в соответствии с инструкциями.

Для утилизации использованных расходных материалов поставляются контейнеры и другое оборудование для сбора, хранения и утилизации соответствующих внутрибольничных отходов (АБРИС+ и другие).

С целью обезвреживания медицинских отходов используют установки, реализующие принцип СВЧ-технологии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Анисько, Л. А.* Современные технологии и методы лабораторной диагностики инфекционных заболеваний: вклад в их реализацию лабораторной службы городской клинической инфекционной больницы г. Минска / Л. А. Анисько, Т. А. Рогачева // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа.* 2020, Т. 9. № 1-2. С. 37–40.
2. *Камышников, В. С.* Техника лабораторных работ в медицинской практике: учеб. / В. С. Камышников. 4-е изд. МЕДпресс-информ, 2016. 344 с.
3. *Камышников, В. С.* Лабораторная диагностика в клинической практике врача: учеб. пособие / В. С. Камышников. Минск : Адукацыя і выхаванне, 2018. 632 с.
4. *Беспалова, С. С.* Контроль качества выполнения иммуноферментного анализа (ИФА) на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах / С. С. Беспалова // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа.* 2019. № 3. С. 326–342.
5. *Лебедев, Ю. С.* Основные источники ошибок при проведении иммуноферментного анализа / Ю. С. Лебедев, Т. В. Карпова. ХЕМА-Медика. Версия 611. 20 с.
6. *Анцилевич, Л. Т.* Контроль качества иммуноферментного анализа / Л. Т. Анцилевич. Казань. ХЕМА. 16 с.
7. *Литус, В. И.* Погрешности в иммунологическом анализе : ч. I / В. И. Литус, И. В. Пшеничная // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа.* 2018. Т. 7. № 4. С. 548–556.
8. *Пшеничная, И. В.* Погрешности в иммунологическом анализе : ч. II / И. В. Пшеничная, В. И. Литус // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа.* 2019. Т. 8. № 2. С. 271–278.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Виды иммунохимического анализа	3
Иммуноферментный анализ	3
Виды ИФА	4
Принцип твердофазного ИФА	7
Методология ИФА	7
Оборудование для выполнения иммуноферментных исследований: его отдельные представители	11
Фотометр универсальный Ф300ТП	11
Автоматические устройства отмывки иммунологических планшетов (типа «МВ-350» и «УСОТ», производства Республика Беларусь)	12
Отечественные тест-системы для иммуноферментного и иммунофлуоресцентного анализа	13
Иммунофлуоресцентный анализ (иммунохемилюминесцентный анализ)	15
Варианты (технологии) иммунофлуоресцентного анализа	15
Принцип и этапы выполнения твердофазного иммунофлуоресцентного анализа	15
Аппаратура, используемая для регистрации твердофазной иммунофлуоресценции	16
Лантанидный иммунофлуориметрический анализ: научные основы и технологические принципы исследования	17
Флуоресцентно-поляризационный иммуноанализ	19
Технология иммунологических электрохемилюминесцентных исследований ECLIA (electrochemiluminescent immunoassay)	20
Аппаратура, используемая для регистрации электрохемилюминесценции	21

Основные этапы клинико-лабораторного иммунохимического исследования и потенциальные погрешности, сопровождающие их выполнение	23
Источники ошибок, характерных для отдельных этапов иммунохимического исследования	24
Преаналитический этап работы	25
Подготовка пациента к клинико-лабораторному исследованию ...	25
Технологии получения сыворотки и плазмы крови	31
Транспортировка образцов сыворотки, плазмы и цельной крови ...	34
Другие факторы, ведущие к внелабораторным ошибкам	35
Погрешности, допускаемые на лабораторном этапе исследования	37
Влияние условий организации деятельности клинико-диагностических лабораторий на качество выполнения аналитических исследований	39
Внутрилабораторные ошибки	42
Молекулярно-биологические факторы погрешностей аналитического этапа выполнения иммунохимического исследования	42
Основные причины и условия возникновения погрешностей, сказывающихся на выполнении аналитического этапа иммуноферментных исследований	44
Погрешности исследования, влекущие искажение результатов фотометрического определения оптической плотности с применением иммуноферментного анализатора	48
Основные практические советы по проведению ИФА	50
Дезинфекция и утилизация изделий лабораторного назначения на постаналитическом этапе выполнения процедуры исследования	52
Список использованной литературы	55

Учебное издание

Камышников Владимир Семенович
Черновецкий Михаил Анатольевич

**ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ:
ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ И ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ
ВАРИАНТЫ ЕГО РЕАЛИЗАЦИИ,
УСЛОВИЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ
НАДЕЖНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск В. С. Камышников
В авторской редакции
Компьютерная верстка А. А. Яцкевич

Подписано в печать 17.01.2024. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 3,49. Уч.-изд. л. 3,05. Тираж 100 экз. Заказ 143.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 24.11.2023.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.