

Красноярский государственный медицинский университет

Екимова М.В., Анисимова Е.Н.

Медицинские лабораторные технологии.

Теоретические и практические основы иммуноферментного анализа

Методические рекомендации для врачей

Красноярск

Содержание

	Введение	3
	Глава 1. Теоретические основы ИФА.....	3
1.1.	Принцип метода.....	3
1.2.	Характеристика реагентов, используемых при постановке ИФА	4
1.3.	Закон действия масс для реакции «антиген – антитело».....	10
1.4.	Принципы классификации ИФА.....	10
1.5.	Схемы постановки ИФА.....	11
	Глава 2. Практические аспекты ИФА.....	13
2.1.	Стандартная комплектация ИФА-набора.....	13
2.2.	Стадии ИФА.....	14
2.3.	Обеспечение качества ИФА.....	18
2.4.	Наиболее часто встречающиеся ошибки при постановке ИФА...	22
2.5.	Характеристики качества тест-систем.....	23
2.6.	Организация ИФА – лаборатории.....	23
	Глава 3. Технологические варианты ИФА.....	24
3.1.	Иммунохроматографический метод.....	24
3.2.	Иммуноблот.....	26
3.3.	Клеточный ИФА.....	26
3.4.	Иммуногистохимия.....	27
	Заключение.....	29
	Список литературы.....	30

Иммуноферментный анализ (ИФА) – вид иммунохимического анализа, основанный на высокоспецифичной иммунологической реакции антигена с соответствующим антителом с образованием иммунного комплекса, для выявления которого в качестве метки используют фермент или фермент-зависимое вещество.

В настоящее время, в связи с реализацией Национального проекта «Здоровье», ЛПУ первичного звена оснащены ИФА-лабораториями в достаточном количестве. Вместе с тем практика показывает, что для успешной работы в такой лаборатории недостаточно слепо и механически следовать инструкции.

Задачей настоящих методических указаний является дать общее представление об иммуноферментном анализе, ознакомить с природой и механизмами процессов, происходящих в лунке планшета. Эта информация позволит осмысленно проводить исследование, грамотно интерпретировать результаты, поможет разобраться в причинах искажения результатов анализа, определить причину возникновения ошибки, сделать правильный выбор при покупке тест-системы.

Глава 1. Теоретические основы ИФА

1.1. Принцип метода

В основе метода ИФА лежит иммунологическая реакция антигена с антителом. Один из этих реагентов является определяемым веществом, а другой – узнающим, обладающим избирательностью по отношению к определяемому веществу.

Для выявления образовавшихся иммунных комплексов «антиген – антитело» в реакционную смесь вводится конъюгат, включающий ферментную метку, а также добавляют специальный хромогенный субстрат. Фермент, взаимодействуя с субстратом, изменяет его окраску, в результате чего бесцветный хромоген превращается в окрашенный хромофор. Учет результатов проводят фотометрически. Количество образовавшихся

комплексов, а тем самым и содержание определяемого вещества, оценивают по содержанию ферментной метки в составе иммунного комплекса. Количество метки определяют по ее каталитической активности.

Тест-системы для ИФА делятся *по своему целевому назначению*. Применительно к диагностике инфекционных заболеваний тест – системы подразделяются на:

- 1) *скрининговые*, призванные при первичном обследовании выявлять инфицированных лиц;
- 2) *диагностические*, используемые при обследовании больных, у которых подозревается или имеется определенная инфекция;
- 3) *подтверждающие*, используемые как дополнительные после получения положительных результатов скрининговых или диагностических тестов.

1.2. Приведем подробную характеристику реагентов и реакций, используемых в иммуноферментном анализе.

Антитела – иммуноглобулины, циркулирующие в кровеносном русле. Известны 5 классов иммуноглобулинов – А, М, Е, G и D.

Антитела, как и многие другие белки организма, обладают *видоспецифичностью* и *родоспецифичностью*. Антивидовые и антиродовые антитела используются в ИФА для определения антител в крови человека к инфекционным патогенам.

В норме в организме человека или животных антитела продуцируются несколькими или даже множеством клонов. Поэтому из сыворотки иммунизированного животного получают препараты поликлональных антител. **Клон** – совокупность продуцирующих антитела клеток, которые имеют одну клетку- предшественницу.

Поликлональные антитела – смесь иммуноглобулинов, различающихся по нескольким характеристикам. В первую очередь, - по избирательности

взаимодействия с антигенными молекулами определенного типа, т.е. по специфичности. Более того, поскольку при использовании поликлональных антител связывается не одна, а практически все имеющиеся на молекуле определяемого вещества антигенные детерминанты, применение поликлональных антител позволяет повысить чувствительность набора.

Однако в связи с тем, что тест-системы с использованием поликлональных антител обладают слабой воспроизводимостью как внутри серии, так и между сериями наборов, была разработана технология получения моноклональных антител.

Искусственное слияние опухолевой клетки и антителопродуцирующей клетки иммунизированного животного позволило получить *гибридому*, обладающую беспредельной потенцией к делению и способностью продуцировать антитела строго определенной специфичности. Получаемые по данной технологии молекулы иммуноглобулинов идентичны друг другу как по строению, так и по специфичности.

Применение моноклональной технологии позволило стандартизовать препараты антител и целенаправленно получать антитела к определенным участкам молекулы антигена. При выборе такого участка отдают предпочтение консервативным (не изменяющимся в процессе филогенеза последовательностям аминокислот), диагностически значимым структурам. Такой подход обеспечивает высокую чувствительность и специфичность ИФА в целом.

Препараты моноклональных антител характеризуются постоянством состава, и физико-химических свойств, низкой вероятностью перекрестной реакции с похожими антигенами. Это – высокотехнологичный продукт. Как следствие, моноклональные антитела имеют следующие преимущества перед поликлональными:

- стандартизованный препарат антител;
- высокая специфичность.

Недостаток моноклональных антител – вследствие низкой аффинности сравнительно низкое сродство к субстрату.

Антигены. Вещества, которые стимулируют иммунную систему организма к синтезу против них антител и могут образовывать с ними специфические иммунные комплексы. Участки, с которыми наиболее часто связываются антитела, называются *антигенными детерминантами*.

В иммуноферментных тест-системах используются антигены различной природы:

1. *Природные белки.* Их выделяют из патогенных микроорганизмов, тканей организма или клеточных культур.

2. *Рекомбинантные белки.* Продуцируются *E.coli*, в геном которой встроены гены, кодирующие необходимый антиген.

3. *Синтетические пептиды.* Короткие пептиды, гомологичные антигенным детерминантам природного белка и синтезированные по аналогии с ними.

4. Неполноценные антигены – *гаптены*. Гаптены представлены низкомолекулярными соединениями, антибиотиками и другими лекарственными средствами, стероидными гормонами, витаминами, пестицидами. Антитела к гаптенам образуются лишь при посадке последних на полимерные матрицы, в качестве которых могут служить их комплексы с белками.

Ферментная метка. Прототипом ИФА был радиоиммунологический анализ. В 1960 году ученые Р.Ялоу и С.Берсон предложили иммунологический метод для определения количественного содержания инсулина в плазме крови человека.

Однако радиоактивная метка имеет целый ряд недостатков. Наиболее существенными из них являются:

- 1) короткое время существования изотопа;
- 2) сложность утилизации радиоактивных отходов;

3) необходимость проведения исследований в специальной лаборатории, оборудованной для работы с радиоактивными изотопами;

4) использование специальной аппаратуры для регистрации гамма-излучения.

Перечисленные причины подтолкнули ученых к поиску нерадиоактивных меток. Предложенная в начале 1970-х годов ферментная метка получила наиболее широкое распространение. Объясняется этот факт преимуществами ферментной метки, которая позволяет осуществлять детекцию комплексов и обладает такими отличительными свойствами, как:

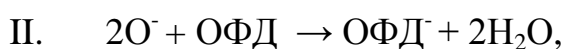
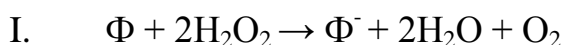
- многократное усиление сигнала, которое осуществляется за счет существования эффекта ферментативного каскада.

- легкость регуляции каталитической активности.

В качестве метки подбираются ферменты, длительно сохраняющие свою активность, не теряющие ее в ходе образования конъюгата с антигеном или антителом и обладающие высокой специфичностью к субстрату.

В качестве метки было предложено к использованию большое количество ферментов. В соответствии с технологическими требованиями, практическое применение нашли три - пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и β -галактозидаза.

Пероксидаза катализирует двухстадийную реакцию:



где Φ – фермент, ОФД – *o*-фенилендиамин (хромоген), ОФД⁺ – хромофор.

Восстановленный бесцветный *o*-фенилендиамин в пероксидазной реакции превращается в окисленную окрашенную форму с максимумом поглощения при 435 нм, регистрируемую фотометрически.

Щелочная фосфатаза катализирует гидролиз фосфорных эфиров. β -галактозидаза - гидролиз лактозы с образованием глюкозы и галактозы.

При проведении фермент-субстратной реакции должны быть соблюдены следующие условия: оптимальное для фермента значение pH, достаточная концентрация субстрата и определенное время протекания реакции, необходимое для проявления каталитической активности ферментной метки.

В определенный момент времени реакцию останавливают внесением так называемого «стоп» - реагента. Таковым являются растворы сильных кислот. Кроме остановки реакции, кислота усиливает окраску раствора хромофора.

Субстраты. В зависимости от типа регистрируемого сигнала в продуктах фермент-субстратной реакции все субстраты можно разделить на 4 группы:

- *хромогенные субстраты*, при использовании которых продукты реакции – хромофоры поглощают свет в видимой области, то есть их растворы окрашены.

- *перекись водорода*. При каталитическом расщеплении перекиси образуется атомарный кислород, который окисляет присутствующий в растворе хромоген с образованием хромофора.

- *флуоресцентные субстраты*. В результате воздействия фермента из них образуются продукты, которые имеют свойство поглощать свет одной длины волны, а испускать – другой. Такое явление называют флуоресценцией. Так, например, субстрат щелочной фосфатазы 4 – метилумбеллиферилфосфат превращается в 4 – метилумбеллиферон, флуоресцирующий с высоким квантовым выходом при 450 нм с возбуждением флуоресценции при 365 нм.

- *люминесцентные субстраты*, при их использовании продукты реакции поглощают кванты света, переходят в возбужденное состояние, а затем испускают свет определенной длины волны, то есть такие растворы светятся.

Необходимо помнить, что ионы трехвалентных металлов, а также кванты света могут вызывать неферментативное разложение перекиси водорода. Кроме того, ферментативная активность пероксидазы подавляется в присутствии некоторых ионов, так называемых «ферментных ядов», к которым относятся анионы фтора. Поэтому при приготовлении субстратных растворов необходимо тщательно следить за качеством применяемой дистиллированной воды и чистотой используемой посуды. Саму фермент-субстратную реакцию проводят в темном месте.

Иммуносорбент. Основой иммуносорбента является твердая фаза, на которой иммобилизованы специфические реагенты (антитела или антигены). Твердая фаза может быть представлена различными полимерными материалами: нитроцеллюлозные полоски мембран, плоскодонные 96-луночные планшеты и шарики (изготавливаются из полистирола).

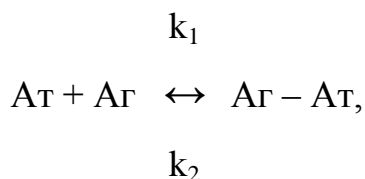
Фирмы-производители поставляют готовый к проведению исследований иммуносорбент, где на полимерной основе иммобилизовано вещество белковой природы. Белок связывается с твердой фазой за счет гидрофобного, водородного или донорно-акцепторного взаимодействия. В редких случаях применяется ковалентное связывание между реакционноспособными группами белка и полимером твердой фазы.

Важным практическим моментом использования иммуносорбента является строгое соблюдение рекомендаций по срокам и режиму хранения тест-систем.

При работе с тест-системами, содержащими разборные (стрипованные) планшеты, необходимо оставшиеся неиспользованными стрипы заново упаковать в хорошо закрытые полиэтиленовые пакеты и хранить при + 4°C, чтобы избежать термической инактивации сорбированных реагентов и предотвратить их десорбцию.

1.3. Закон действия масс для реакции «антиген – антитело»

В результате реакции антигена с антителом происходит формирование иммунного комплекса. Процесс реакции выражается формулой:



где k_1 – константа скорости прямой реакции,
 k_2 – константа скорости обратной реакции.

Константы показывают, какая доля молекул вступает в реакцию с образованием комплексов. Затем наступает стадия равновесия, при этом концентрация молекул в обеих частях уравнения остается неизменной. При достижении равновесия концентрация комплекса «антиген – антитело» намного превышает собственно концентрации антигена и антитела.

Следствием закона действия масс является положение, лежащее в основе расчета содержания определяемого вещества: концентрация свободных и связанных молекул в составе комплексов остается неизменной и является производной от концентрации определяемого антигена.

Поскольку антитела и антигены чаще всего поливалентны, то есть одно антитело может связываться с несколькими антигенами и наоборот, то для суммарной характеристики степени их связывания обычно используют термин авидность. Именно авидность определяет константу равновесия и чувствительность анализа.

1.4. Принципы классификации ИФА

Количественный анализ в ИФА может быть проведен в соответствии с двумя основными подходами:

1. Прямое измерение количества образовавшихся иммунных комплексов.
2. Регистрация количества мест связывания, оставшихся свободными.

Первый подход подразумевает направленное воздействие на ферментативную активность комплекса АГ– АТ – Ф, ведущее к торможению или, напротив, возрастанию скорости реакции. Этот подход может быть реализован в однофазной системе – в растворе, и поэтому такой ИФА называется *гомогенным* или *жидкофазным*. Хотя гомогенному ИФА присущи быстрота и малая трудоемкость, он характеризуется сравнительно низкой чувствительностью.

Второй подход – физическое разделение с помощью твердой фазы, связывающей меченый реагент. Это – *гетерогенный* или *твердофазный* ИФА. Гетерогенный ИФА выполняется в течение более продолжительного времени, но более чувствителен, чем гомогенный ИФА.

Как гомогенный, так и гетерогенный анализ может быть конкурентным или неконкурентным. В *неконкурентном* ИФА активность фермента линейно зависит от концентрации антигена в определяемом образце.

В *конкурентном* анализе образец, содержащий антиген в неизвестной концентрации, смешивают с определенным количеством антигена, меченого ферментом (конъюгата), и добавляют к антителам, фиксированным на полистироловой подложке. Антиген и антиген - фермент конкурируют за ограниченное количество мест связывания с антителами. Активность фермента в конкурентном анализе обратно пропорциональна концентрации антигена в исследуемом образце.

1.5. Схемы постановки ИФА

В настоящее время наиболее часто используется гетерогенный конкурентный и неконкурентный ИФА, схемы постановки которого приведены на рис. 1 – 2.

В *конкурентном* методе, как уже упоминалось выше, имеет место конкуренция между фиксированным количеством меченых и неизвестным количеством определяемых антител. Так как количество антигена на твердой фазе ограничено, конъюгата связывается тем меньше, чем больше

анализируемого антигена в пробе. После удаления в ходе промывки не связавшихся компонентов реакции измеряют ферментативную активность иммобилизованного комплекса антиген – антитело.

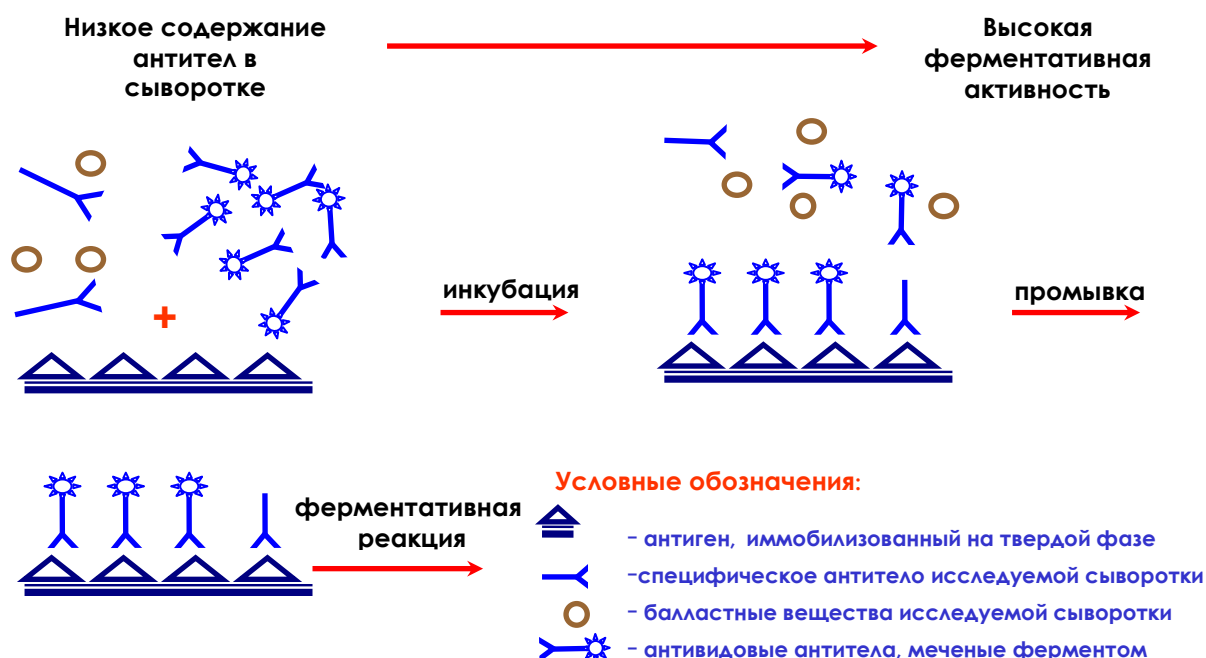


Рис. 1. Схема гетерогенного конкурентного ИФА [5].

«Сэндвич» - метод. Предназначен для определения достаточно больших молекул, обладающих по меньшей мере двумя антигенными детерминантами. К каждой из этих детерминант получают специфические антитела. Особенностью метода является создание сложного иммунного комплекса, построенного по принципу «сэндвич» - два ломтика хлеба и прослойка между ними (рис.2).

Комплекс образован антигеном и двумя антителами, связанных с молекулой антигена в двух разных эпитопах. Иммобилизованное на твердой фазе первое антитело, связываясь с соответствующим эпитопом, захватывает из раствора молекулу антигена. Антитело, входящее в состав ферментного конъюгата, обладает специфичностью к другому участку молекулы антигена. По окончании инкубации проводят промывку, удаляют несвязавшуюся часть конъюгата, вносят раствор субстрата (хромогена) и измеряют

ферментативную активность твердой фазы, которая прямо пропорциональна количеству антигена в пробе.

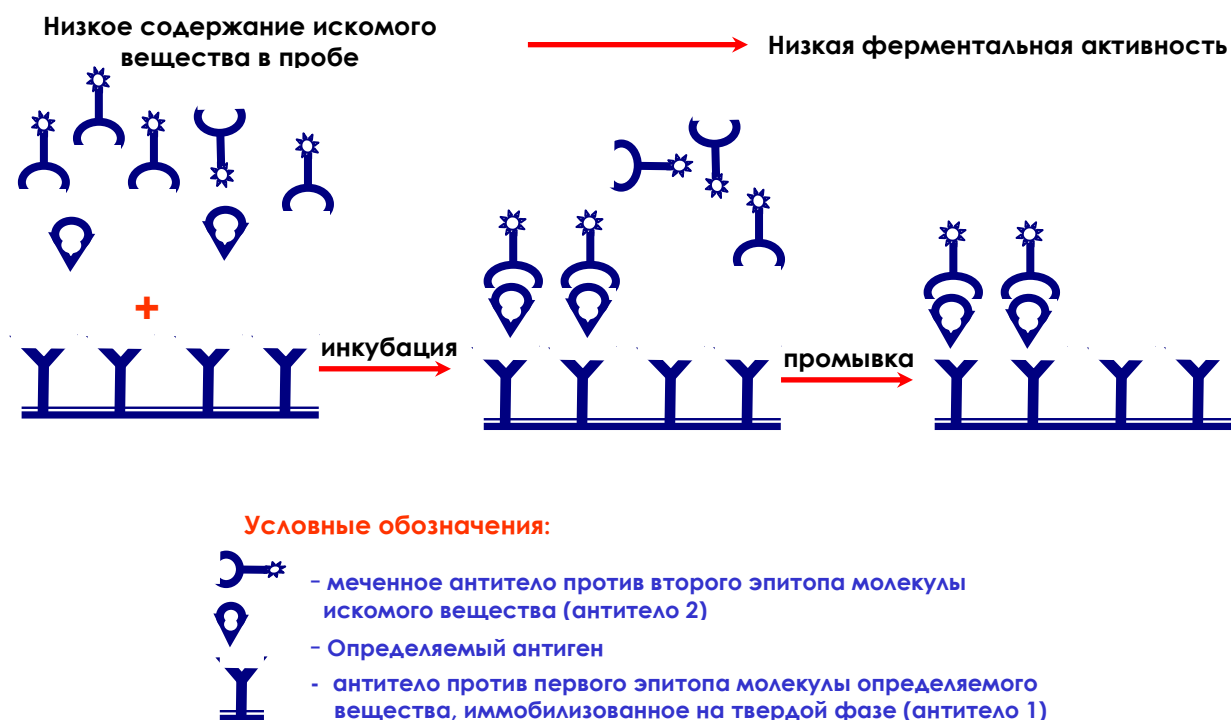


Рис. 2. Схема гетерогенного неконкурентного ИФА [5].

В качестве иллюстрации более редко используемых технологий приводим схему проведения гомогенного конкурентного анализа с радиоактивной меткой (рис.3).

Глава 2. Практические аспекты ИФА

2.1. Стандартная комплектация ИФА – набора

ИФА – набор включает все необходимые для анализа реагенты на 96 определений.

В набор реагентов, как правило, входят:

1. **Стандарты.** 5 – 7 растворов с различными концентрациями определяемого анализа
2. **Конъюгат.** Содержит антитела или антиген с ферментной меткой

3. 96-луночный микропланшет, **иммуносорбент**, упакованный в алюминиевую фольгу с осушителем

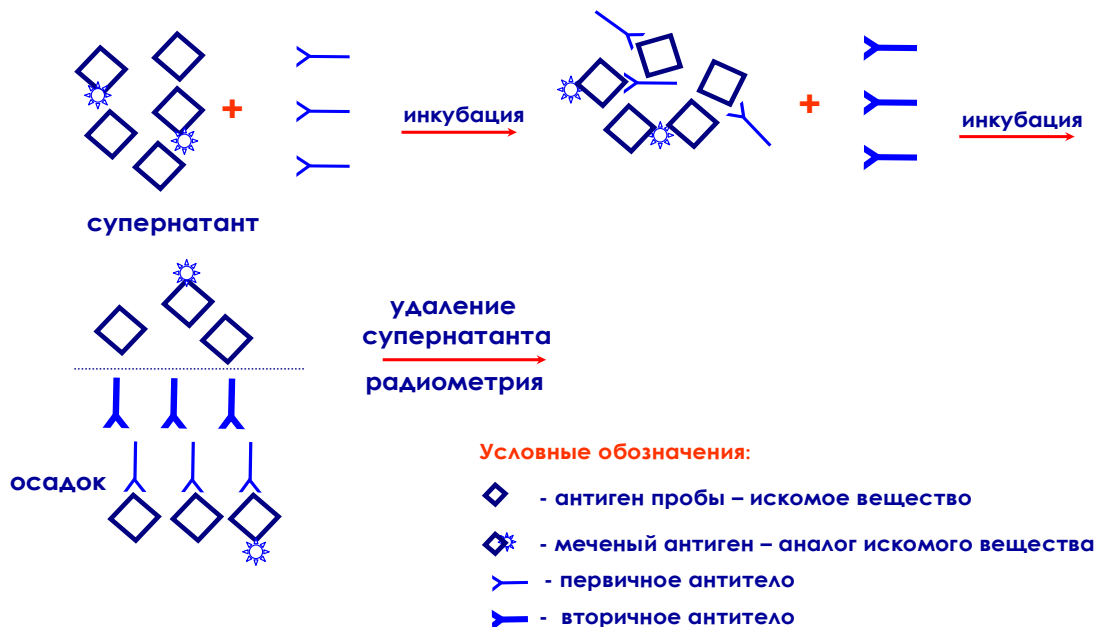


Рис.3. Схема гомогенного конкурентного анализа (РИА) [5].

4. **Субстратно-хромогенный реактив** – монореагент, либо реагент, состоящий из двух компонентов: раствор А, обычно содержащий тетраметилбензидин (ТМБ) в буфере, и раствор В – перекись водорода в буфере.

5. **Стоп – раствор.** Чаще всего раствор соляной кислоты.

6. Концентрат **промывочного буфера.**

7. **Контрольная сыворотка** (одна или несколько).

Дополнительно в набор могут входить реагенты для разведения образцов, конъюгата, субстрата, стандарта.

2.2. Стадии ИФА

1. *Проведение иммунной реакции.* Образование иммунного комплекса в результате взаимодействия антигена и антител, при этом один из

компонентов реакции содержит ферментную метку. Кинетика иммунной реакции зависит от специфичности антител, степени очистки антигена, температуры, площади твердой фазы, состава буферного раствора и режима перемешивания-встряхивания реакционной смеси.

Проведение иммунной реакции в 96-луночном планшете при температуре выше комнатной сопряжено с возникновением так называемого «краевого» эффекта. Он заключается в том, что в ячейках, расположенных по периметру планшета, иммунные реакции протекают более интенсивно по сравнению с лунками в центре. Вследствие этого происходит изменение оптической плотности образцов, что искажает результаты исследования.

«Краевой» эффект обусловлен неодинаковым нагревом плашки: крайние части нагреваются быстрее и дольше центральных инкубируются при повышенной температуре. Инкубация при комнатной температуре не сопровождается проявлением краевого эффекта.

2. *Промывка твердой фазы.* Промывка твердой фазы преследует три цели:

- разделение свободных и связанных в комплекс реагентов.
- удаление веществ, неспецифически связавшихся с твердой фазой.
- удаление балластных примесей – катализаторов или ингибиторов ферментативной реакции.

Порядок промывки: сначала удаляют из лунки реакционную смесь, осушая лунку. Затем лунки заполняют промывающим раствором и удаляют его. В состав промывающего раствора входят различные неионные детергенты, например, Твин 20, а также мочевины или хлористый натрий.

Основным условием качественной промывки твердой фазы является заполнение лунки промывающей жидкостью выше уровня вносимых реагентов и максимальное ее удаление.

3. *Проведение ферментативной реакции.* После формирования на твердой фазе иммунного комплекса, в состав которого входит фермент, и

удаления несвязавшихся компонентов, к твердой фазе добавляют раствор субстрата с последующим внесением стоп-реагента для остановки реакции.

4. *Учет результатов анализа.* Регистрация результатов ИФА заключается в измерении оптической плотности окрашенных растворов или квантового выхода флюоресценции / люминесценции.

Измерение оптической плотности окрашенных растворов проводится визуально, либо при помощи фотометра. Визуальный способ заключается в сравнении интенсивности окрашивания опытного и контрольного образцов.

При проведении ИФА на индикаторных полосках применяют такие субстраты, продукты ферментативного превращения которых нерастворимы и образуют на мембранах окрашенные полосы, опытную и контрольную. Они хорошо видны на белом фоне, поэтому учет результатов можно проводить визуально.

Оптическую плотность раствора в лунках планшета измеряют при помощи фотометров с вертикальным прохождением света. Длина волны выбирается в соответствии с максимумом поглощения продуктами превращения конкретного субстрата.

5. *Интерпретация результатов анализа.* Проводится два вида оценки результатов – качественный и количественный (рис.4).



Рис.4. Варианты учета результатов реакции

Качественная оценка предполагает выдачу двух вариантов ответа: результат положительный или отрицательный, то есть искомое вещество обнаружено, либо нет. Качественный анализ часто используется при проведении скрининговых исследований и в диагностике инфекционных заболеваний.

В тест-системах для качественного анализа результат исследования определяется при сравнении его оптической плотности с расчетной величиной критической оптической плотности, для обозначения которой часто используется термин cut-off или «пороговое значение оптической плотности». Формула для расчета cut-off указывается в инструкции к тест-системе. В расчете участвуют как усредненные значения оптических плотностей положительного и отрицательного контролей, так и оптическая плотность специального контрольного образца.

Если оптическая плотность образца выше, чем cut-off, образец считается положительным, то есть содержащим специфические антитела. Если оптическая плотность образца ниже уровня cut-off, то образец – отрицательный.

Иногда образец попадает в так называемую «серую зону». Серая зона – это диапазон концентраций специфических антител, в который попадают «сомнительные» результаты - с равной вероятностью положительные или отрицательные пробы. Границы серой зоны указываются в инструкции к тест-системе. Как правило, это 10% пороговой величины. Результаты анализов, попавших в серую зону, интерпретируются как «сомнительные», неоднозначные, и должны быть повторены с новой сывороткой, полученной от пациента через 1 – 2 недели.

Для количественной оценки тест-система содержит ряд стандартных растворов определяемого вещества с известными концентрациями. По результатам анализа стандартных растворов строят калибровочную кривую, отражающую зависимость оптической плотности от концентрации антигена.

По калибровочной кривой, зная оптическую плотность опытной пробы, рассчитывают концентрацию определяемого вещества.

2.3. Обеспечение качества ИФА

Эффективность ИФА как универсального диагностического метода во многом зависит от выполнения мероприятий по обеспечению качества исследования.

Применительно к диагностической лаборатории, выполняющей ИФА - исследования, качество – это правильно и своевременно назначенный тест для нуждающегося в нем пациента, выполненный на достаточном аналитическом уровне с необходимой информацией для его интерпретации.

Понятие качества распространяется на все этапы лабораторного тестирования: *преаналитический, аналитический и постаналитический*.

Преаналитический этап. На него приходится более половины от общего количества ошибок, повлиявших на результат анализа. Значительная часть этапа проходит вне лаборатории, поэтому врач клинической лабораторной диагностики, который в первую очередь отвечает за лабораторную часть, должен следить за соблюдением требований вне лаборатории, так как это является одной из важных составляющих процесса обеспечения качества лабораторных исследований.

Преаналитический этап включает в себя следующие мероприятия: назначение анализа, сбор и транспортировка образцов, их регистрация, хранение до момента исследования, деление и распределение по видам исследования, процедуры пробоподготовки и деления проб по видам исследования.

Внелабораторная часть начинается с назначения лечащим врачом конкретному пациенту лабораторного исследования на основании наиболее вероятного диагноза, поставленного в ходе сбора анамнеза и физикальных обследований.

В связи с тем, что правильное назначение тестов и использование результатов анализа является составной частью обеспечения качества работы лаборатории, необходимо информировать врачей-клиницистов о внедрении новых исследований в лаборатории и их диагностической ценности, об устаревших тестах. Врачи лаборатории должны консультировать лечащих врачей по применению тестов.

Неправильное выполнение процедур по подготовке пациента является одним из основных источников (до 20%) ошибок на преаналитическом этапе, поэтому процедура взятия крови и других образцов в инструкции для персонала должна быть описана всесторонне, включая детальное описание технологии взятия венозной крови, нативной или с добавлением антикоагулянтов – основного материала для ИФА-исследований.

Рекомендации по условиям забора крови и других биожидкостей для лабораторного исследования методом ИФА:

1. Пробы следует забирать между 7 и 9 часами утра.
2. Взятие проб должно выполняться через 8 – 12 часов после последнего приема пищи.
3. Взятие проб должно выполняться до проведения диагностических и лечебных процедур, способных оказать влияние на результаты теста.
4. Кровь для исследования на вещества, концентрация которых в крови изменяется циклически, должна забираться в строгом соответствии с физиологическими циклами.
5. Перед забором крови обследуемый должен находиться в покое, сидеть или лежать не менее 5 минут.
6. Сдавление сосудов вен при наложении манжеты при взятии крови не должно превышать 1 минуты.
7. Существуют 3 способа получения венозной крови при венепункции: - кровь забирается самотеком в пробирку для сбора крови;

- кровь аспирируется шприцем;
- кровь забирается в вакуумные пробирки с помощью коммер-

ческих вакуумных систем.

8. Пробы крови должны быть доставлены в лабораторию в течение 1 – 2 часов после взятия крови, и должны сохраняться при низкой температуре.

9. Образцы и пробы всегда должны храниться в закрытых сосудах, особенно если их объем небольшой.

10. Необходимо избегать встряхивания сосудов с пробями.

11. Необходимо хранить сосуды с кровью в вертикальном положении.

Отказы в приеме клинического материала на исследования должны быть зафиксированы документально. Критерии отказа должны быть проработаны и известны врачам-клиницистам заранее.

Аналитический этап включает технологический процесс проведения исследований: подготовка реагентов и приборов, выполнение протокола анализа, проведение процедур контроля качества, регистрация и математическая обработка результатов исследований. Контроль качества на аналитическом этапе основывается на использовании контрольных материалов.

Постаналитический этап. Представляет собой работу с результатами, полученными в ходе аналитического этапа, и включает следующие мероприятия: запись результатов в лабораторный журнал, формирование отчетов по пациентам, передачу результатов лечащему врачу; интерпретацию результатов.

Принципы внутрилабораторного контроля качества основываются на выполнении отраслевого стандарта ОСТ 91500.13.0001 – 2003 «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием

контрольных материалов», утвержденного приказом МЗ РФ №220 от 26.05.03.

Цель проведения внутрилабораторного контроля качества – достижение стабильности аналитической системы. Обязательным условием проведения ИФА является постановка контрольных материалов. Контрольные материалы ставятся в каждой постановочной серии. Производится регулярное исследование контрольных материалов вместе с пробами пациента, после чего сравниваются результаты измерения контрольных материалов с рассчитанными статистическими пределами.

Порядок проведения внутрилабораторного контроля качества описан в отраслевом стандарте ОСТ 91500.13.0001 – 2003 «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов», введенный в обращение приказом МЗ РФ №220 от 26.05.03., и состоит из 3 последовательных стадий:

Стадия 1: оценка сходимости результатов измерений.

Стадия 2: выполнение установочных серий измерений с оценкой воспроизводимости измерений, заполнение контрольных карт.

Стадия 3: проведение оперативного контроля качества результатов лабораторных исследований в каждой аналитической серии.

Внешняя оценка качества лабораторных исследований. ФСВОК проводит работы по внешней оценке качества клинических лабораторных исследований с 1995 г. Целью деятельности ФСВОК является оказание помощи клиничко-диагностическим лабораториям в обеспечении качества выполняемых исследований. Участие во ФСВОК является обязательным, и свидетельство об участии лаборатории во ФСВОК требуется при лицензировании медицинской деятельности.

Одной из наиболее популярных в мире программ внешней оценки качества является программа EQAS производства «Био-Рад лаборатории».

Современный уровень развития лабораторной техники и информационных технологий позволяет перевести постаналитический этап проведения лабораторных исследований на качественно новый уровень за счет использования специализированных компьютерных программ или даже ЛИС – лабораторных информационных систем.

2.4. Наиболее часто встречающиеся ошибки при постановке ИФА

1. Использование реагентов с истекшим сроком годности.
2. Неправильное хранение открытых реагентов. Следует помнить, что открытые реагенты стабильны 30 – 60 дней при хранении от 2 – 8°C в зависимости от типа набора.
3. Смешивание реагентов из наборов разных серий.
4. Использование охлажденных реагентов. Перед началом работы все реагенты должны быть прогреты до комнатной температуры (18 – 24 °C). При дробном использовании набора следует сократить до минимума нахождение растворов при комнатной температуре и, особенно, в открытом виде.
5. Использование долго хранившейся дистиллированной воды. Для растворения лиофилизированных компонентов, а также для приготовления рабочих растворов из концентрированных препаратов, входящих в состав набора, необходимо использовать свежую дистиллированную (деионизированную) воду со значением pH, близким к нейтральному.
Срок хранения дистиллированной воды не должен превышать 2 – 3 дня. Нельзя добавлять в дистиллированную воду консерванты, поскольку они могут повлиять на активность ферментной метки.
6. Рабочие растворы конъюгата и субстрата обычно готовятся за 10 – 15 минут до внесения в планшет.
7. Каждый из исследуемых образцов следует вносить, используя новый наконечник для пипетки. При применении многоканальной пипетки следует использовать новые наконечники для каждого реагента. При

пипетировании необходимо избегать прикосновения наконечника к стенке и дну лунки.

Таким образом, основными пунктами, на которые следует обратить особое внимание при постановке ИФА, являются:

1. Проверка пипеток, термостатов, спектрофотометров.
2. Качество дистиллированной воды.
3. Правильная подготовка образцов.
4. Внимательное чтение инструкции по использованию набора.
5. Правильный расчет «серой зоны».

2.5. Характеристики качества тест-систем

Чувствительность отражает вероятность, с которой при помощи тест-системы можно определить наличие исследуемого вещества в опытном образце.

Специфичность – характеристика избирательности тест-системы. Показывает, насколько вероятно, что реакция будет протекать именно с искомым веществом, а не с другими компонентами опытного образца.

2.6. Организация ИФА-лаборатории

Под лабораторию следует отводить просторное светлое помещение, в которое подведены вода, канализация, электричество с заземлением, центральное отопление. Средняя норма площади на 1 работающего составляет около 14 м².

Так как в большинстве протоколов выполнения ИФА-теста предусмотрена стадия инкубации при комнатной температуре, необходимо соблюдать температурный режим в помещении лаборатории 18 - 25°C.

В лаборатории должны быть предусмотрены помещения для взятия материала у больных, помещение для хранения реактивов и образцов, аппаратная, центрифужная, моечная, бытовая комната для сотрудников.

Оборудование для ИФА. Комплекс оборудования для ИФА-лаборатории, на котором можно производить весь спектр тестов в микропланшетном формате включает в себя автоматические дозаторы, специальный инкубатор, а также промывающее устройство и фотометр для микропланшет (вошер и ридер).

По конкурсу на поставку оборудования для ИФА, проведенному в рамках Национального проекта «Здоровье» в 2006 году, в лаборатории ЛПУ первичного звена поставляются вошеры PW40 и ридер – модель 680, выпущенные компанией «Био-Рад лаборатории».

Глава 3. Технологические варианты ИФА

3.1. Иммунохроматографический метод

Позволяет получить качественный результат в виде полоски преципитата при погружении тест-кассеты в пробу. В реакционной системе в ходе латеральной диффузии антигена или антитела сыворотки взаимодействуют с антителами или антигенами, иммобилизованными на тест-полоске.

На одном участке пористой мембраны иммобилизован определяемый антиген, на другой участок наносится конъюгат антител против антигена с красителем. При погружении мембраны в раствор, не содержащий детектируемого антигена, меченые антитела перемещаются с фронтом жидкости по мембране и, дойдя до зоны с иммобилизованным антигеном, вступают в ферментативную реакцию с образованием окрашенной полосы (выпадение преципитата).

Если же в растворе содержится анализируемый антиген в концентрации не ниже установленного уровня, он блокирует активные центры антител, не позволяя им связываться с антигеном в тестовой зоне и сформировать окрашенную полосу. Контролем сохранения функциональных свойств тест-полоски служит связывание избытка коллоидного конъюгата с

антивидовыми антителами, т.е. образование окрашенной полосы в контрольной зоне.

Иммунохроматографические тест-кассеты обладают достаточно высокой чувствительностью, простотой методического выполнения, по скорости выполнения относятся к экспресс-тестам, анализ может быть выполнен у постели больного. Однако все полученные экспресс-анализы должны быть обязательно воспроизведены в стационарной лаборатории.

Вариантом практического применения иммунохроматографического метода являются *индикаторные полоски*. Особенностью индикаторных полосок является использование системы ферментных каналов, предусматривающей включение двух ферментов. Пара энзимов подбирается таким образом, чтобы продукты одной ферментативной реакции служили субстратами для второго фермента. Поверхность полоски покрыта антителами против антигена. Вместе с антителами на твердой фазе иммобилизованы молекулы фермента глюкозооксидазы.

Технология исследования: готовую полоску погружают в исследуемый образец. Антитела связывают молекулы антигена из образца. Степень заполнения вакантных антител пропорциональна концентрации антигена.

Затем индикаторную полоску переносят в раствор, содержащий конъюгат стандартного антигена с пероксидазой, субстрат для глюкозооксидазы и хромоген. Глюкозооксидаза катализирует превращение глюкозы в глюкуроновую кислоту с образованием перекиси водорода. Атомарный кислород, образующийся в результате ферментативного расщепления перекиси, окисляет хромоген. В результате образуется голубое нерастворимое соединение, которое преципитирует на полоске. Для упрощения интерпретации полученных результатов в индикаторные полоски вводят внутренний стандарт.

Регистрацию проводят визуально или с помощью фотометра, предназначенного для измерения отраженного света. Такой вариант ИФА не требует промывок и разделения связанных и свободных молекул конъюгата.

Анализируемый материал не требует предварительного разведения и дополнительной обработки.

3.2. Иммуноблоттинг

В практике лабораторной диагностики некоторых заболеваний существует необходимость определить спектр специфических антител или комплекс антигенов. Качественный метод, позволяющий выявлять несколько антигенов или антител ко всем значимым белкам патогена в исследуемой пробе одновременно и в то же время дифференцированно на нитроцеллюлозной мембране или полосках.

Антигены в заводских условиях нанесены на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрана инкубируется с исследуемой пробой, на нее последовательно наносятся вторичные антитела, проводится ферментативная реакция. В качестве хромогена используют растворимое бесцветное вещество, продукт которого окрашен, становится нерастворимым и преципитирует на нитроцеллюлозе.

В результате поэтапно проведенной иммуноферментной реакции при наличии в исследуемой пробе антител к белкам патогена на блоте появляются темные поперечные полоски, расположение которых находится в зоне определенных белков патогена, т.е. в зоне протекания ферментативной реакции.

Результат исследования методом иммуноблота выдается в виде перечня антигенов или антител к конкретным белкам патогена. Метод применяется в качестве подтверждающего при диагностике некоторых инфекционных болезней и в качестве диагностического в аллергодиагностике.

3.3. Клеточный ИФА

Предназначен для исследования антигенов (антител), экспрессированных на наружной мембране клеток, например антигенов CD – клеточных рецепторов соответствующих субпопуляций лимфоцитов. По качественному и количественному составу рецепторов судят о содержании в

крови той или иной субпопуляции лимфоцитов (рис.5). Альтернативой данному методу является давно используемый метод проточной флуориметрии.

3.4. Иммуногистохимический метод

Современный, высокочувствительный метод идентификации и определения локализации в клетке и ткани различных структур, имеющих антигенные свойства, основан на реакции антиген-антитело. Особенность метода заключается в том, что твердой фазой в этом случае служит сам срез ткани, а определяемое вещество иммобилизовано естественным образом на этом подобии иммуносорбента.

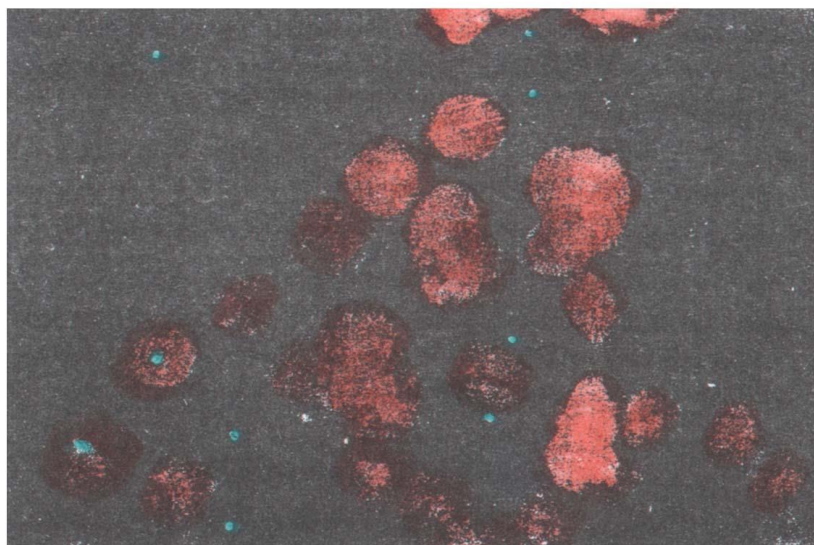


Рис.5. *Chlamidia trachomatis* в мазке со слизистой уретры в препарате, окрашенном антителами «ХламиСлайд»

Метод позволяет определять наличие антигенов при исследовании срезов тканей. В технологии используются высокоавидные и высокоспецифичные моноклональные антитела, направленные к одному эпитопу антигена. Особенностью метода является использование вторичных

антител, связанных с биотин-стрептавидиновой системой, конъюгированных с ферментной меткой, например со щелочной фосфатазой или пероксидазой хрена. Проявление пероксидазы осуществляется диаминобензидином. В результате продукт реакции выявляется в виде коричневого стойкого окрашивания мембраны. С помощью иммерсионной микроскопии оценивается распределение искомого антигена в клетках ткани (рис. 6).

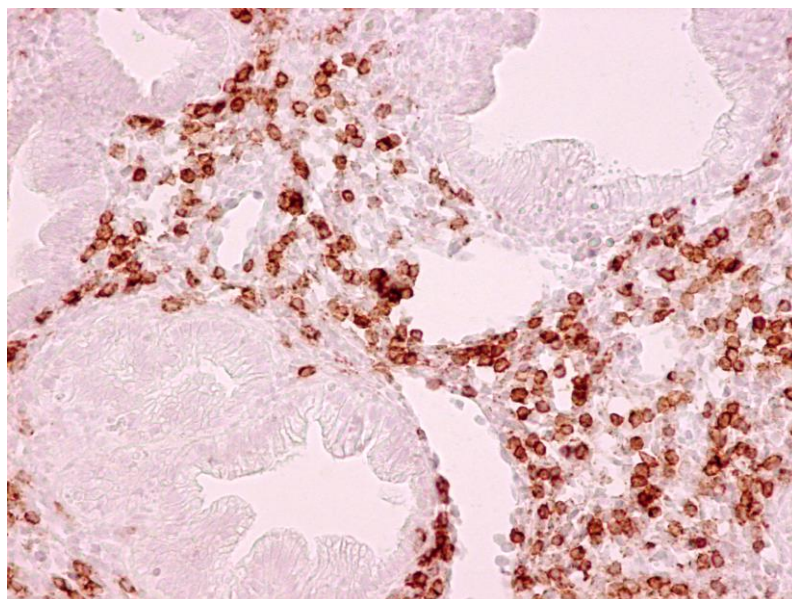


Рис. 6. Иммуногистохимическое окрашивание с целью идентификации CD56⁺. Идентификация по коричневому мембранному окрашиванию CD56⁺ в строме и отсутствию окрашивания в железистом эпителии секреторного эндометрия (Увеличение, х 400).

Технология исследования: Перед проведением методики зафиксированную формалином и покрытую слоем парафина ткань обрабатывают таким образом, чтобы обеспечить доступ антител к ее структурам. При работе со срезами тканей очень важно, чтобы размеры меченого специфического реагента позволили ему эффективно проникать в тканевые структуры.

Иммуногистохимическое исследование проводят на парафиновых срезах с помощью двухэтапного авидин-биотинового метода, включающего демаскировку антигенов с помощью высокотемпературной обработки ткани. В связи с этим иногда в качестве дополнительной неферментативной метки используют пару биотин-авидин. Молекула авидина содержит 4 активных центра для связывания биотина. Благодаря этому авидин может связывать не одну, а несколько биотинилированных молекул какого-либо вещества.

На первом этапе образцы тканей депарафинизируют и дегидрируют, после чего наносят 3% перекись водорода для блокирования эндогенной пероксидазы.

Далее проводят инкубацию срезов во влажной камере с первыми антителами. После этого проводят инкубацию со вторыми биотинилированными антителами. Затем проводят инкубацию со стрептавидин-биотин-пероксидазным комплексом. Для выявления пероксидазы применяют диаминобензидин + хромоген.

Интерпретация результатов осуществляется в световом микроскопе. Долю окрашенных клеток (места локализации иммунных комплексов) высчитывают в %.

Заключение

Благодаря своей высокой чувствительности, специфичности и технологической простоте ИФА получил широкое распространение в медицинской лабораторной диагностике.

Среди важнейших преимуществ ИФА стоит назвать:

- большой срок годности наборов;
- относительно недорогое оборудование для ИФА-лабораторий (за исключением автоматических анализаторов);
- относительная простота выполнения исследований;
- количественный анализ;
- коммерческая доступность;

- экологическая чистота.

Среди недостатков:

- как правило, меньшая точность и чувствительность анализа, а также
- более узкий диапазон определяемых концентраций;
- трудоемкость процедуры анализа;
- зависимость ферментативной стадии анализа от ряда физико-химических факторов (температура, рН, качество воды, свет, продолжительность анализа).

Однако методы ИФА постоянно совершенствуются. Повышается чувствительность и специфичность тест-систем, подбираются наиболее удобные условия для работы, сокращается число этапов проведения исследований, что способствует уменьшению возможностей совершения ошибочных действий.

Вместе с тем, ИФА – лишь один из способов определения антигенов, основанный на взаимодействии антигена с антителом и детекции образовавшегося комплекса при помощи метки. Кроме ферментной метки в методах иммунохимического анализа успешно используются радиоактивные, люминесцентные и флуоресцирующие соединения. Применение неферментных меток позволяет увеличить чувствительность иммунохимических методов, уменьшить до нескольких часов время проведения анализа и автоматизировать проведение исследований.

Литература:

1. А.Г.Таранов. Диагностические тест-системы (радиоиммунный и иммуноферментный методы диагностики). – М.: Издатель Мокеев, 2002. – с. 44 – 49.
2. Современные технологии лабораторной медицины: Учебное пособие/ Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, О.Б.Жукова и др. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», - 2008. – с.8 – 13.

3. В.В. Долгов, Н.Г.Ракова, В.Е.Колупаев, Н.С.Рытикова. Иммуноферментный анализ в клинико-диагностических лабораториях. – М. – Тверь: ООО «Изд-во «Триада», 2007. – с. 220 – 310.
4. Иммунофлуоресцентный метод в диагностике инфекционных заболеваний: Учебно-методические рекомендации для врачей / А.И.Блинов, Н.А. Глушанова. – Новокузнецк, 1998. – 42 с.
5. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник. Медицинские лабораторные технологии / Под ред. А.И.Карпищенко. – СПб: Интермедика, 1999. – с.438 – 497.
6. В.Д.Самуилов. Иммуноферментный анализ. Соросовский образовательный журнал, - 1999, № 12. – с.9 – 15.
7. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М.Егоров, А.П. Осипов, Б.Б.Дзантиев и др. – М.: Высшая школа, 1991.- 288 с.
8. А.В.Масяго. Некоторые ошибки при постановке ИФА. – Кольцово, 2004. – 32 с.
9. Мошкин А.В., Долгов В.В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике: Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. – М.:Медиздат, 2004. – 191 с.
10. Эллиниди В.Н., Аникеева Н.В., Максимова Н.В. Практическая иммуногистохимия: Методические рекомендации. – СПб.: ВЦЭРМ МЧС России, 2000. – 36 с.