

Введение.

Эффективность использования ИФА как универсального диагностического метода во многом зависит от выполнения процедур по обеспечению качества исследования. Весь путь от назначения лечащим врачом исследований до получения, интерпретации и использования их результатов исследований в лечебном процессе делят на 3 этапа:

1. *Преаналитический этап* – от назначения врачом исследований до начала исследований.

2. *Аналитический этап* – этап исследований и измерений.

3. *Постаналитический этап* – выдача результатов лабораторных исследований и измерений, оценка и использование их лечащим врачом в лечебном процессе.

Ошибки могут возникать на любом из этапов, но если должным образом налажен внутрिलाбораторный контроль качества, то по статистике ошибок (по оценкам разных специалистов) от 60% до 75% ошибок исследований порождены погрешностями преаналитического этапа. Аналитический этап является прерогативой лаборатории и заключается в проведении анализа в соответствии с определенной методикой. на него приходится не более 20% ошибок. на постаналитическом этапе правильный диагноз и эффективное лечение зависит от лечащего врача. Поэтому основная задача ИФА – лаборатории – максимальная стандартизация преаналитического этапа исследований и тщательное выполнение аналитического этапа.

Составитель:
Лия Михайловна Анцилевич
Кандидат биологических наук
Ассистент кафедры КЛД КГМА

Материал для исследования методом ИФА.

Материалом для иммунологических исследований могут служить различные биологические жидкости: сыворотка, плазма крови; моча; спинномозговая жидкость; амниотическая жидкость; слюна и др.

Преаналитический этап

Преаналитический этап включает следующие процедуры:

- назначение анализа,
- подготовка пациента,
- сбор и транспортировка образцов,
- их регистрация,
- хранение до момента исследования,
- разделение и распределение по видам исследования,
- процедуры пробоподготовки.

Для уменьшения количества ошибок, совершаемых на этом этапе, необходимой и эффективной мерой является составление руководителем лаборатории совместно с лечащими врачами инструкции по качеству выполнения этапа, которая описывает стандартные процедуры с учетом особенностей работы данного учреждения. К стандартным процедурам этого этапа относятся: составление заявки, взятие и доставка пробы, ее регистрация, оценка качества пробы, хранение, процедура пробподготовки и распределение проб.

Назначение анализа и оформление заявки

Преаналитический этап начинается с назначения лечащим врачом конкретному пациенту лабораторного исследования. Именно лечащий врач заполняет заявку, определяет условия подготовки пациента (например, натощак), исследуемый материал (кровь, моча, ликвор и т. п.).

Правильное назначение тестов и использование результатов анализа является составной частью обеспечения качества работы лаборатории. Поэтому 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.

Структура ошибок преаналитического этапа лабораторных исследований в экспресс-лаборатории.

Подготовка пациента

Неправильное выполнение процедур подготовки 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. Условия подготовки пациента удобно отражать в виде памятки в направлении на анализ, где следует указать ошибки и рекомендации при взятии венозной крови основного материала для ИФА исследований.

В инструкции по качеству проведения преаналитического этапа необходимо четко прописать условия взятия биологического материала для исследования.

Внутренние факторы, такие как раса, пол и возраст, мышечная масса и общая масса тела могут влиять на концентрации исследуемых аналитов. Эти факторы являются индивидуальными особенностями пациента, поэтому их нельзя устранить.

Неустрашимые факторы

– **Возраст** может влиять на концентрации анализов в крови и моче в период сразу после рождения, в пубертатный период и в старости.

– **Раса.** Содержание анализов от расовой принадлежности. Существенные различия в активности амилазы обнаружены между коренными жителями Западной Индии и исконными британцами. Исходя из общепринятого порогового значения, 50% уроженцев Западной Индии имели повышенную активность амилазы.

– **Пол.** Как и в отношении внешнего вида и специфичных для каждого пола гормональных уровней, различия могут быть обнаружены и в клинико-химических и гематологических показателях.

– **Беременность.** Трактруя результаты лабораторных исследований у беременных, необходимо учитывать срок беременности в момент взятия пробы. При физиологической беременности средний объем плазмы возрастает примерно от 2600 мл до 3900 мл, причем в первые 10 недель прирост может быть незначительным, а затем происходит нарастающее увеличение объема к 35 неделе, когда достигается указанный уровень. Хорошо известные свойственные беременности изменения выработки и концентрации в плазме половых гормонов сопровождаются изменениями различных анализов, например тироидных гормонов, метаболитов, электролитов, белков и некоторых диагностически важных липидов, ферментов, факторов свертывания и компонентов фибринолитической системы.

Изменение физического состояния

– **Диета** и потребление жидкости служат основными факторами, влияющими на многие анализы в клинической химии.

– **Голодание.** Длительное голодание тесно связано со снижением расхода энергии и, как следствие, в сыворотке снижены концентрация Т4 и в еще большей степени Т3.

– **Физические упражнения.** Следует выделить 2 типа упражнений. При упражнениях первого типа – статических или изометрических упражнениях короткой продолжительности и высокой интенсивности – используется энергия, уже запасенная в мышцах (АТФ, креатинфосфат), и при упражнениях второго типа – динамических или изотонических упражнениях малой интенсивности и большой продолжительности (например, бег, плавание, езда на велосипеде) – используется АТФ, образуемый аэробным или анаэробным путем. Кроме того, следует учитывать влияние физической тренированности и мышечной массы. Быстро возникающие изменения анализов во время упражнений обусловлены сдвигами объемов жидкости между внутрисосудистым и интерстициальным пространствами, потерей жидкости в связи с потоотделением и изменением концентрации гормонов (например, повышения концентрации адреналина, норадреналина, глюкагона, СТГ, кортизола, АКТГ и снижения концентрации инсулина).

– **Высота над уровнем моря.** Содержание некоторых компонентов крови подвержено значительным изменениям в зависимости от высоты над уровнем моря. С увеличением высоты значительное повышение наблюдается в отношении, например С-увеличенного белка (до 65% на высоте 3600 м), (32-глобулина в сыворотке (до 43% на высоте 5400 м), гематокрита и гемоглобина (до 8% на высоте 1400 м) и мочевой кислоты. Адаптация к высоте занимает недели, а возвращение к значениям на уровне моря происходит в течение нескольких дней. Значительное снижение величин с ростом высоты над уровнем моря обнаружено в отношении мочевого креатинина, клиренса креатинина, эстриола (до 50% на высоте 4200 м), осмоляльности сыворотки, ренина плазмы и трансферрина сыворотки.

Стимуляторы и вызывающие зависимость препараты в качестве

влияющих факторов биологического характера.

– **Кофеин** содержится во многих компонентах повседневной пищи. Несмотря на его широкое распространение, влияние кофеина на различные клинико-химические анализы детально не исследовано. Через 3 часа после приема 250 мг кофеина повышается активность ренина плазмы и концентрация катехоламинов. Следовательно, при исследовании данных анализов потребление кофеина должно учитываться.

– **Влияние курения.** Курение вызывает множество острых и хронических изменений концентраций анализов, причем хронические эффекты скорее умеренные. Курение повышает концентрации в плазме или сыворотке жирных кислот, адреналина, свободного глицерина, альдостерона и кортизола. Эти изменения наблюдаются в пределах 1 часа при курении 1–5 сигарет.

– **Алкоголь.** Употребление алкоголя в зависимости от его продолжительности и степени может влиять на многие анализы. Эти изменения частично используются для диагностики и терапевтического мониторинга. Среди обусловленных алкоголем изменений следует выделять остро и хронически возникающие изменения.

Взятие образцов

– Влияние циркадного ритма

Некоторые анализы обнаруживают тенденцию к колебаниям их концентрации в плазме в течение суток. Ритм кортизола является причиной недостоверных результатов теста на толерантность к глюкозе, проводимого во второй половине дня. По этой причине референтные интервалы обычно устанавливаются при исследованиях между 7 и 9 часами утра. на циркадном ритме могут отражаться влияния индивидуальных ритмов – еды, сна, физической активности. Эти влияния не следует путать с действительно циркадными колебаниями. в некоторых случаях следует учитывать сезонные влияния. Так, содержание трийодтиронина (Т3) на 20% ниже летом, чем зимой, тогда как 25-ОН-холекальциферол обнаруживается в большей концентрации летом.

Суточные колебания содержания некоторых анализов в сыворотке крови

Аналиты	Мак.конц.(время)	Мин.конц.(время)	Амплитуда(%)
АКТГ	6–10	0–4	150–200
Кортизол	5–8	21–3	180–200
Тестостерон	2–4	20–24	30–50
ТСГ	20–2	7–13	5–15
Т4	8–12	23–3	10–20
ТТГ	21–23	1–21	300–400
Пролактин	5–7	10–12	80–100
Альдостерон	2–4	12–14	60–80
Ренин	0–6	10–12	120–140
Адреналин	9–12	2–5	30–50

– Анализы могут изменяться в течение менструального цикла.

Статистически значимые изменения анализов могут быть вызваны колебаниями уровней гормонов при менструации. Так, концентрация альдостерона в плазме

определяется в два раза выше перед овуляцией, чем в фолликулярной фазе. Подобным образом, ренин может проявить преовуляторное повышение.

- **Влияние лекарств.** в настоящее время около 30% людей, а в старших возрастных группах значительно больше, постоянно в течение месяцев и даже лет принимают определенные лекарственные препараты. Входящие в них химические вещества и образующиеся продукты превращения постоянно содержатся в крови человека. При биохимических анализах они могут вступать во взаимодействие с используемыми реактивами, искажать ход реакции и приводить к завышению или занижению истинного результата (химическая интерференция). Если постоянно принимаемый препарат нельзя отменить на несколько дней (с учетом времени распада и выведения), то это необходимо учесть при трактовке результатов

- **Выбор времени по отношению к диагностическим и лечебным процедурам.** Многие диагностические процедуры способны оказывать влияние на результаты лабораторных исследований.

При подготовке обследуемых к проведению биохимических исследований должны быть приняты следующие подходы:

- лекарства, мешающие определению компонентов, исключаются до взятия биоматериала, если они даются не по жизненным показаниям;
- утренний прием лекарств проводится только после взятия биоматериала;
- взятие крови с диагностической целью производится до проведения инфузии лекарств и растворов.

Загрязнение лабораторных проб инфузионными растворами является самой обычной и часто встречаемой формой преаналитической интерференции в больницах. Рекомендуется информировать лабораторию о том, когда и какое вливание было проведено пациенту и когда была взята проба крови. Пробы следует брать из другой руки, из вены, в которую не проводится вливание. Перед тем, как производить взятие пробы после проведенной инфузионной терапии, следует выждать определенный период времени.

Взятие проб у пациента.

Рекомендации по условиям взятия крови и других жидкостей для лабораторного исследования методом ИФА:

1. По возможности, пробы следует брать 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 любых диагностических и лечебных процедур, способных оказать влияние на результаты теста.
4. В случае проведения лекарственного мониторинга следует учитывать фармакокинетику: наличие пика концентрации после введения лекарственного препарата и динамику снижения концентрации.
5. Период воздержания от приема алкоголя должен быть не менее 24 ч до взятия биожидкости.
6. Кровь для исследования на вещества, концентрация которых в крови изменяется циклически, должна забираться в строгом соответствии с физиологическими циклами.
7. Для исключения влияния изменения положения тела обследуемый должен находиться в покое, сидеть или лежать не менее 5 мин.
8. При динамическом наблюдении за пациентом взятие материала нужно проводить при идентичном положении тела пациента.
9. Сдавление сосудов (вен) при наложении жгута (манжеты) при взятии крови должно быть минимальным и не превышать 1 мин.

10. Всегда следует отмечать точное время взятия пробы в соответствующих документах.

Весь биоматериал, доставляемый в КДЛ должен иметь сопроводительное направление, номер которого совпадает с номером емкости с биоматериалом.

В направлении должны быть указаны Ф.И.О. пациента, пол, возраст, отделение, палата, № истории болезни, диагноз, название посылаемого материала, заказываемые исследования, дата и время сбора биоматериала, Ф.И.О. лечащего врача, Ф.И.О. и подпись специалиста забравшего биоматериал.

Процедура взятия крови. Иммунологические исследования чаще всего используют в качестве образца сыворотку или плазму крови. Первичным биоматериалом в этом случае является венозная кровь, с добавлением или без добавления антикоагулянтов. Использование венозной крови для иммунологических исследований более предпочтительно, чем капиллярной, так как она лучше отражает состояние организма, при ее получении возникает меньше ошибок, она может быть получена в большем объеме.

Стандартная процедура получения плазмы и сыворотки из цельной венозной крови.

Взятие венозной крови осуществляет процедурная медсестра. Непосредственно перед взятием крови участок кожи над пунктируемой веной с особой тщательностью обрабатывается ватным тампоном с 70% спиртом. Перед взятием крови дезинфицирующее средство должно испариться с поверхности кожи. Продолжительность пережатия сосудов жгутом или манжетой не более 1 мин. При взятии из венозного катетера первые 10 капель крови удаляются. 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.

Существуют 3 способа получения венозной крови после венепункции:

- кровь самостоятельно стекает в пробирку для сбора крови;
- аспирируется шприцем;
- кровь забирается с помощью вакуумной технологии в специальные (вакуумные) пробирки с помощью коммерческих систем забора крови.

Взятие крови из локтевой вены должно осуществляться иглой с широким просветом самотеком (или при незначительном разрежении) в чистую сухую пробирку в количестве 5–6 мл. Для забора крови желателно использовать пластиковую посуду. Стекланные пробирки часто несут на поверхности следы детергентов, а также обладают способностью обмениваться ионами с кровью. Пробирки, бывшие долго в употреблении, имеют поврежденную поверхность, что при транспортировке и центрифугировании травмирует клеточные элементы, может привести к гемолизу эритроцитов. Собранные образцы маркируют в соответствии с принятой в лаборатории системой идентификации образцов.

Для стандартизации процедуры, с целью исключения ошибок, рекомендуется использовать вакуумные пробирки с необходимым консервантом.

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

1. стерильная двусторонняя игла;

2. держатель пробирки;
3. пластиковая пробирка с круглым дном и предохранительными заглушками, предупреждающими обратный ток крови и нарушение стерильности. Ток крови прерывается, как только прекращается действие вакуума.

Вакуумные системы для взятия крови:

- обеспечивают стандартизированное получение венозной крови в гарантированно стерильных условиях;
- исключают контакт персонала с кровью;
- обеспечивают визуальный контроль забираемого объема крови;
- взятие может быть осуществлено для различных видов исследований;
- пробирки, в которые берется кровь, являются одновременно центрифужными, транспортными и сосудами для хранения и пересылки материала в другие лаборатории.

Вакуумные пробирки, выпускаемые различными производителями (Вакутейнеры фирмы Бекман Диксон, США; Моноветы фирмы Сарштадт, Германия, Вакуэты фирмы Грейнер Лабортенк, Австрия; Веноджеты II, фирмы Терумо Медикал корп., США и др.) подразделяются по целевому назначению.

Пробирки для получения сыворотки рассчитаны на различные объемы крови и либо не содержат добавок, либо внутрь пробирки добавлены ускорители свертывания в виде различных гранул, стеклянных или силикатных шариков. Для разделения сгусткам сыворотки используется также инертный полимерный гель.

Для получения плазмы используют аналогичные устройства, но с добавлением различных антикоагулянтов. в зависимости от того, какие компоненты надо определить, пробирки содержат тот или иной антикоагулянт с включением или без включения разделительных гелей и гранул из полистирола.

Крышки пробирок маркированы, они сделаны из пластика или резины разных цветов, что помогает медсестре, которая берет кровь на исследование, правильно выбрать пробирку для соответствующего вида анализа.

Перед взятием крови следует проверить серию и срок годности пробирок, т.к. при очень длительном хранении вакуум ослабевает и эффективность вытекания крови из вены может уменьшаться. Отклонение объема пробы в заполненной пробирке не должно превышать $\pm 10\%$ от объема, указанного на этикетке.

Сыворотка.

Сыворотку получают из спонтанно свернувшейся цельной крови. Она не содержит факторов свертывания крови, 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 меньше. в нормальной крови сгусток образуется при комнатной температуре в течение 20–60 мин. Если не соблюдать время, то может иметь место латентное (запоздалое) свертывание, в результате которого (особенно при использовании анализаторов) происходит закупорка проточных элементов сгустками и затрудняется пипетирование проб. в пробирках из пластика время свертывания удлинится.

Плазма.

Плазма получается из крови путем отделения клеток. в противоположность сыворотке она содержит факторы свертывания крови и является частью крови, получаемой при центрифугировании крови, свертываемость которой ингибирована добавлением антиагулянтов. Плазма и сыворотка содержат около 93% воды,

а цельная кровь около 81%. в связи с этим концентрация компонентов в плазме на 12% выше, чем в цельной крови.

Преимущества плазмы по сравнению с сывороткой:

1. Меньшая опасность возникновения гемолиза.
2. Выход плазмы при центрифугировании на 10-20% больше по сравнению с сывороткой, а при использовании коммерческих пробирок с антикоагулянтом – на 30-40%, что особенно важно в педиатрии, у ослабленных больных, у пожилых людей.
3. Более быстрое получение материала для исследования в связи с исключением этапа образования сгустка. Это особенно важно при выполнении срочных анализов.
4. Концентрация компонентов в плазме в большей степени отражает состояние *in vivo*. Исключается потеря метаболитов за счет разрушения во время инкубации, необходимой для получения сгустка.

Основным недостатком использования плазм является возможность ингибирования некоторых ферментов в присутствии антикоагулянтов. Поэтому выбор антикоагулянтов для получения плазмы зависит от цели исследования.

Антикоагулянты. Наиболее частой ошибкой при отборе крови для получения плазмы является неправильный подбор антикоагулянтов.

Наиболее часто используют трикальциевую или динатриевую соли ЭДТА, тринатрий-цитрат и гепарин. ЭДТА и тринатрий-цитрат ингибируют коагуляцию путем удаления кальция из крови. Несоответствие концентрации антикоагулянта объему взятой крови и недостаточно тщательное смешивание могут привести к значительным ошибкам.

Транспортировка образцов. Влияние времени и температуры

Полученная кровь должна быть своевременно доставлена в лабораторию. Согласно рекомендациям практически всех компаний – производителей иммуноферментных тест-систем, необходимо не позже 1 часа после взятия крови отобрать из нее сыворотку. Согласно приказу №170 от 16.08.94 г. Министерства здравоохранения и медицинской промышленности РФ «О мерах по совершенствованию профилактики и лечению ВИЧ инфекции в Российской Федерации», полученный материал (кровь) не рекомендуется хранить более 12 ч при комнатной температуре и более 1 суток в холодильнике при 4-8 °С. Происходящий в этом интервале гемолиз может повлиять на результаты анализа.

В таблице приведены временные интервалы, рекомендованные при проведении процедуры пробоподготовки.

Требования ко времени выполнения некоторых преаналитических этапов для иммунологических исследований

Наименование биожидкости и этапа	Время от момента получения биожидкости или предыдущего этапа
Центрифугирование для получения сыворотки	Не позднее, чем через 1 час после взятия крови
Центрифугирование охлажденной крови	30–90 мин после взятия из холодильника
Центрифугирование в пробирках с ускорителями свертывания крови	5–15 мин
Центрифугирование в пробирках с антикоагулянтами для получения плазмы.	Возможно немедленно после взятия

Отделение сыворотки от сгустка во вторичную (транспортную) пробирку после центрифугирования	Тотчас после центрифугирования
Взятие сыворотки из пробирки с гелевым барьером	Не позднее 48 ч после центрифугирования
В пробирках с негелевым барьером	Не позднее, чем через 1 час
Сыворотка, плазма, если нельзя выполнить анализ в течение 5 часов	Поместить биожидкость в холодильник на 24 часа

Рекомендации по условиям хранения и транспортировке биологического материала для иммунологических исследований:

1. Быстрая транспортировка и короткий срок хранения улучшают достоверность результатов лабораторных исследований. Избегайте хранения цельной крови.
2. Образцы и пробы сохраняются тем лучше, чем ниже температура их хранения.
3. Образцы и пробы всегда должны храниться в закрытых сосудах (чтобы избежать испарения и контаминации)
4. Проблемы хранения уменьшаются при использовании одноразовых систем для сбора проб.
5. Разделительные элементы (например, разделительные гели) позволяют оставлять сыворотку в первичных пробирках над сгустком.
6. Избегайте условий, когда возможно встряхивание сосудов с пробями (системы пневматической доставки пробирок): риск гемолиза увеличивается.
7. Всегда храните сосуды с кровью в вертикальном положении. Избегайте воздействия света.
8. Маркируйте инфицированный материал и обращайтесь с ним с особой осторожностью.

Как предупредить интерференцию, вызванную гемолизом. Многие компоненты, определяемые в плазме, содержатся в довольно высокой концентрации в клетках крови. Поэтому для получения достоверных результатов следует предотвратить возникновение гемолиза. Гемолиз определен как «высвобождение компонентов клеток крови в плазму/сыворотку». Наличие гемолиза обычно распознается по появлению более или менее выраженного ирregularного окрашивания плазмы/сыворотки после центрифугирования, связанного с высвобождением гемоглобина из эритроцитов.

В случае подтверждения гемолиза и ожидаемой интерференции, результаты, полученные при исследовании гемолизированной пробы, не должны учитываться (или проба не должна подвергаться исследованию). Если новая проба не может быть получена, клиницист должен получить информацию относительно возможной степени искажения результатов анализа. Гемолиз можно предупредить путем стандартизации преаналитического этапа. Использование стандартного ирregularного окрашивания пробирок и калиброванных центрифуг существенно помогает уменьшить гемолиз.

Как предупредить интерференцию, вызванную мутностью. Поскольку нормальные пробы не обладают мутностью, за исключением взятых после приема жирной пищи, мутность пробы всегда клинически значима и должна быть оценена, документирована и отмечена в бланке лабораторного анализа. Она может указывать на гипертриглицеридемию, вызванную завышением содержания хиломикронов, липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) или и тех, и других. Отчетливый сливкообразный слой, плавающий над прозрачным слоем после центрифугирования и хранения свыше 12 часов в холодильнике, указывает на наличие хиломикронов.

Наоборот, более гомогенная мутность в большинстве случаев вызвана присутствием в повышенной концентрации ЛПОНП.

Лабораторная часть преаналитического этапа: Регистрация и хранение образцов. Пробоподготовка.

Лабораторная часть этого этапа исследований начинается с момента доставки образца вместе с заявкой в лабораторию и включает в себя следующие процедуры:

- организация приема и регистрации проб и заявок,
- отбраковка проб, не пригодных для анализа,
- хранение проб до анализа,
- разделение проб для выполнения нескольких видов анализа, перенос образцов во вторичные пробирки,
- распределение проб по видам исследований, заполнение рабочих штативов и картирование (расположение образца на планшете) микропланшетов.

Пробоподготовка.

Первым этапом, который осуществляется непосредственно в лаборатории, является пробоподготовка. Основной ошибкой при центрифугировании является применение в протоколах пробоподготовки показателя скорости вращения центрифуги вместо относительной центрифужной силы, которая рассчитывается по формуле $OЦС = 1.118 \times \text{радиус (об/мин/1000)}^2$ и зависит от радиуса используемой центрифуги. Другим источником ошибок на этапе пробоподготовки является аликвотирование проб – сыворотка разливается 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 клинического материала на исследования должны быть определены заранее и зафиксированы в документах. Низкое качество образцов описывается следующими критериями: превышение сроков доставки, наличие сгустков в плазме или сыворотке, другие специфические критерии – гемолиз, желтушность, высокое содержание липидов, мутность пробы. При составлении документального описания критериев выбраковки клинического материала следует пользоваться следующими инструкциями:

Основное правило – образец для иммуноферментного анализа должен быть прозрачным. Присутствующие в образце частицы фибрина или сгустки, бактериальная контаминация, а также гемолизованный или хилезный проба могут давать ложноположительные результаты. Образцы могут храниться при 2–8 °С в течение времени, указанного в инструкции. Обычно для анализа антител это время не более трех суток. Для более длительного хранения образец необходимо заморозить. Чем больше срок хранения образца, тем ниже должна быть температура хранения. При хранении образцов при -70 °С, чтобы избежать вымораживания образцов, рекомендуется использовать специальные криопробирки. Следует избегать многократного замораживания.

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

Храните пробы после проведения анализа таким образом, чтобы в случае необходимости можно было подтвердить результаты, проверить идентичность проб или провести дополнительные тесты по медицинским или правовым показаниям.

Аналитический этап

Аналитический этап включает технологический процесс проведения исследований, подготовку реагентов и приборов к проведению исследования, выполнение протокола анализа, проведение процедуры контроля качества, регистрацию, математическую обработку результатов исследований.

Контроль качества на аналитическом этапе исследований основывается на использовании контрольных материалов. Их анализ – так называемые контрольные измерения, дают возможность сделать заключение о достоверности и воспроизводимости получаемых в лаборатории результатов.

Факторы, влияющие на аналитический этап.

Факторы, влияющие на создание аналитического качества, можно разделить на постоянные и переменные, внешние – не зависящие от пользователя и внутренние, которые пользователь может контролировать.

К постоянным внешним факторам относятся обстоятельства, связанные с характеристиками метода ограничения аналитического принципа, ограничения характеристик оборудования, выбор производителя реагентов, ограничения характеристик тест систем а также прослеживаемость калибровки для количественных тестов.

Переменные внешние факторы зависят от серии реагентов, калибраторов, расходных материалов.

Внутренние факторы, в первую очередь, это условия выполнения ИФА.

К постоянным внутренним факторам относятся условия выполнения теста, калибровка пипеток, качество воды, качество отмывки, соблюдение температурных и временных ошибок инкубации. Однако на выполнение теста могут влиять и другие условия – время проведения, температура в лаборатории, объемы исследований и т. д. Также имеет большое значение стандартизация этапов исследований.

Переменные внутренние факторы связаны с конкретной реализацией теста. К ним относятся неправильные действия, связанные с недостаточной квалификацией персонала, ошибка при внесении образцов и реагентов, несделанное вовремя обслуживание прибора, отсутствие контроля процедуры исследования с ведением журнала ошибок и описанием проблем и т. д.

Постоянные факторы определяют систематическую ошибку и контролируются внешней оценкой качества. Переменные факторы обуславливают случайную ошибку в исследовании, которая может быть зафиксирована внутрилабораторным контролем качества.

Внешняя оценка качества (ВОК)

ВОК – это объективная оценка результатов лаборатории, осуществляемая внешней организацией, в том числе путем сравнения результатов лаборатории с интервалом результатов других лабораторий, преимущественно с целью оценить их правильность (систематическую погрешность). Все клинические лаборатории должны участвовать в системе ФСВОК (Федеральной системе внешнего контроля качества).

Внутрилабораторный контроль качества (ВЛК)

ВЛК – это объективная проверка результатов, постоянно осуществляемая непосредственно в лаборатории, в том числе путем алгоритмов оценки измерений контрольных материалов преимущественно с целью оценить их воспроизводимость (случайную погрешность).

Иначе говоря, ВЛК представляет собой оперативный контроль результатов до их передачи для клинического использования, а ВОК является ретроспективной оценкой результатов после их клинического использования. Правильность результатов оценивается с помощью ВОК, и далее лабораторный работник должен полагаться на их воспроизводимость, которую отражает ВЛК.

Правила проведения ВЛК подробно описаны в приказе МЗ РФ № 220 от 26.05.2003 г.

Полноценный контроль качества в каждой клинико-диагностической лаборатории – это обязательное сочетание внутрилабораторного контроля и внешней оценки качества. Они дополняют друг друга и создают единую систему управления аналитическим качеством в лаборатории. Участие в программах внешней оценки качества не заменяет проведение внутрилабораторного контроля и наоборот.

Процедура ВЛК основана на ежедневном измерении контрольного материала в рамках рутинной процедуры тестирования.

Обязательным условием проведения ИФА является анализ контрольных материалов. Контрольные материалы включаются в каждую серию анализа.

Контрольные материалы (КМ)

КМ – это максимально приближенный к человеческому образец, в идеале изготовленный из биологических жидкостей человека. КМ должны анализироваться так же, как пробы пациентов. Они могут быть жидкими или лиофилизированными и содержать один или более известных аналитов (обычно КМ содержат множество различных аналитов). КМ нормального уровня содержит нормальные концентрации определяемого аналита. КМ патологического уровня содержит повышенное или сниженное по сравнению с нормальными значениями количество аналита.

При ВЛК используются КМ с аттестованными и неаттестованными значениями контролируемых показателей. Аттестованным значением является значение измеряемой характеристики контрольного материала (концентрации вещества), установленное при его аттестации и приводимое в паспорте и других документах на контрольный материал. Для одного и того же показателя в документах на КМ может быть указано несколько значений отдельно по каждому методу измерения. КМ с аттестованными и неаттестованными значениями могут быть использованы для исследования воспроизводимости результатов.

КМ должны соответствовать следующим требованиям:

- Матрица, т.е. состав и свойства биологического материала, в котором находится измеряемый компонент (сыворотка крови, плазма, цельная кровь моча или другой биологический материал), предпочтительнее человеческого происхождения. Использование КМ животного или смешанного происхождения допускается, за исключением некоторых аналитических методов (ограничения указываются в инструкции производителя).
- Уровни исследуемых компонентов в КМ должны соответствовать значениям показателей в нормальном и патологическом диапазоне; за нормальный принимается диапазон значений лабораторного показателя, соответствующий состоянию здоровья обследуемого, за патологический – диапазон, соответствующий состоянию болезни пациента.
- Перечень компонентов в паспорте закупаемого КМ должен соответствовать исследуемым в лаборатории показателям.
- Методы определения показателей в КМ должны соответствовать методам, применяемым в конкретной лаборатории.
- Срок годности КМ после изготовления:
 - для аттестованных КМ при хранении лиофилизированных форм при 2–8 °С – более 1 года;

- для неаттестованных КМ при хранении лиофилизированных форм при 2–8 °С – более 2 лет;
- для жидких КМ (готовых к употреблению) при 2–8 °С – не менее 3 месяцев;
- после вскрытия флакона или восстановления лиофилизированных форм – 4–8 часов при 20–25 °С; время восстановления лиофилизированных форм – не более 30 минут.

Выбор контрольных материалов для внутрилабораторного контроля качества – ответственный этап в работе каждой КДЛ. До последнего времени предпочтение отдавалось контрольным материалам западных производителей. в настоящее время на рынке появились контрольные сыворотки производства фирмы «ХЕМА», Россия. Они в несколько раз дешевле импортных аналогов и отвечают всем необходимыми требованиям, которые описаны в приказе МЗ РФ № 220 от 26.05.2003 г.

В настоящее время ХЕМА производит доступные контрольные материалы для ИФА анализа серий ГормоКон (для контроля гормональных исследований), АутоКон АТ (для контроля аутоиммунных патологий щитовидной железы), ПренаКон (для контроля пренатальной диагностики развития плода) и ОмаКон (для контроля онкомаркеров). Это первые контрольные материалы для ИФА отечественного производства. К достоинствам наборов контролей Хема можно отнести:

- Соответствие требованиям приказа МЗ РФ № 220.
- Широкий спектр контролируемых показателей. ГормоКон дает возможность контролировать более 20 наименований гормонов в одном флаконе, АутоКон предназначен для контроля аутоиммунных маркеров патологий щитовидной железы, в том числе и для контроля уровня антител к рецепторам ТТГ. ПренаКон дает возможность контролировать широкий спектр пренатальных маркеров: АФП, бетаХГЧ, ПАББ-А, свободный эстриол. Патологический уровень ПренаКон сформирован специально для диагностики синдрома Дауна. Наконец, в паспорте к ОмаКон значится 16 наименований онкомаркеров – один из самых широких спектров на данный момент.
- Контроль показателей, как в нормальном, так и в патологическом диапазоне.
- Возможность использования контрольных сывороток при работе на реактивах как всех основных отечественных производителей ИФА наборов (ХЕМА, Алкор-Био, Вектор-Бест, НВО ИммуноТех), так и наиболее широко распространенных хемилюминисцентных методик (Бауер Биодиагностикс – Адвиа Центавр, DPC Immulite).
- Длительные сроки хранения – не менее года в лиофильно-высушенном состоянии, не менее 5 суток после растворения, 30 суток при -15 °С.
- Значительно более низкая цена по сравнению с импортными аналогами.

Подготовка и использование компонентов набора. Режим хранения.

Распространенной ошибкой является неправильная подготовка и использование компонентов набора, а также нарушение режима его хранения. Рекомендации:

1. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
2. Открытые реагенты стабильны 30–60 дней при хранении от 2 до 8 °С в зависимости от типа набора.
3. Не смешивайте реагенты из наборов разных серий.
4. Перед началом работы все реагенты должны достичь комнатной температуры. При детальном использовании набора следует сократить до минимума нахождение растворов при комнатной температуре и, особенно, в открытом виде.
5. Для растворения лиофилизированных компонентов, а также для приготовления рабочих растворов из концентрированных препаратов, входящих в состав набора, необходимо использовать дистиллированную (или деионизированную) воду

со значением pH, близким к нейтральному (не менее 6,0). Лиофилизированные компоненты должны быть растворены не менее, чем за 10–15 мин. до использования, и раствор тщательно перемешивают – не менее 10 раз.

6. Перед использованием тщательно перемешать реагенты во флаконах. Отбирайте из флакона только необходимое количество реагентов. И когда не сливайте излишки реагентов обратно во флаконы во избежание контаминации. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.
7. Перед вскрытием пакета с планшетом его следует выдержать при комнатной температуре примерно 30 мин. для предотвращения конденсации влаги на планшете. Если планшет разборный, и используются не все стрипы сразу, то после вскрытия оставшиеся стрипы следует немедленно поместить в пакет с влагопоглотителем и плотно его закрыть,
8. Для приготовления растворов используйте только тщательно вымытую (лучше одноразовую) посуду.
9. Избегайте попадания света на раствор хромогена и конъюгата.
10. Рабочие растворы конъюгата и субстрата обычно готовятся за 10–15 мин. до внесения в планшет (если нет особых указаний в инструкции к набору реагентов) в количестве, необходимом для анализа.

Выбор ИФА наборов определенного производителя.

В настоящее время в России производятся качественные ИФА наборы для достаточно широкого спектра исследований. При выборе определенного производителя необходимо обращать внимание на:

- Спектр выпускаемых наборов. Самый широкий спектр на данный момент предлагает ХЕМА.
- Стабильность наборов. Наборы производства ХЕМА стабильны не менее года, после вскрытия – не менее 60 дней.
- Удобство работы с реагентами. Все реагенты производства ХЕМА готовы к использованию, не требуют растворения или смешивания. Все наборы комплектуются четкими пошаговыми инструкциями, максимально облегчающими программирование методик на различных типах анализаторов.
- ХЕМА является непосредственным производителем компонентов для ИФА наборов, что гарантирует низкие цены и своевременность поставки реагентов.

Практические советы по постановке ИФА

1. Составьте схему расположения бланка, стандартов, контролей и образцов на планшете. Убедитесь, что все необходимые реагенты и образцы нагрелись до комнатной температуры.
2. Если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов (например, 2 образца внесены в одну лунку), нельзя, удалив сыворотку из этой лунки, вносить в нее новый образец.
3. Каждый из исследуемых образцов следует вносить, используя новый наконечник для пипетки.
4. Следите за точностью пипетирования. Чтобы свести к минимуму возможные вариации из-за разного времени инкубации, вносите реагенты с одной и той же скоростью.
5. Оптимизируйте промывание и режим работы с микропланшетом. Слишком интенсивное удаление жидкости вошером может подсушить белковое покрытие в ячейке, инактивировав его, а слишком слабое приведет к тому, что останутся капельки жидкости. Не оставляйте ячейки сухими между стадиями добавления реагентов. Если в ходе работы возникли непредвиденные задержки, заполните

ячейки промывающим раствором.

6. Рекомендуется, чтобы все образцы анализировались в дублях.
7. Одной из причин получения неудовлетворительных результатов при использовании твердофазных наборов является использование шейкеров-инкубаторов, которые не обеспечивают необходимую интенсивность встряхивания. Наборы производства фирмы ХЕМА в основном не требуют использования шейкеров. Инкубация проводится без встряхивания при комнатной температуре или при 37 °С в термостате.
8. Температурный режим инкубации также является фактором, оказывающим влияние на протекание иммунохимической реакции в лунке. Низкая температура в лаборатории (менее 18 °С) приводит к тому же результату, что и плохое встряхивание.
9. Во время инкубации необходимо заклеить микропланшет адгезивной пленкой или закрыть крышкой, за исключением стадии инкубации с субстратом (только с помощью крышки!).
10. Инкубируйте планшеты с субстратом в темноте, этим Вы сможете избежать краевых эффектов на планшете.
11. Регулярно проверяйте точность работы Вашего оборудования.
12. Необходимо наличие постоянно действующей внутрилабораторной системы контроля качества анализов и участие лаборатории в системе внешнего контроля качества анализов.
13. В выборе фирмы-поставщика ИФА – реагентов и оборудования ориентируйтесь на тех производителей, которые овладели всеми тонкостями данного метода, гарантируют поставки качественной продукции, оказывают сервисную и методическую поддержку пользователям и хорошо зарекомендовали себя в России.
14. Желательно, чтобы выбранные тест-системы были укомплектованы 1–3 различными уровнями контролей или были совместимы с международными контрольными материалами.
15. Для лабораторий с небольшим объемом исследований важно, чтобы после вскрытия набора его компоненты оставались стабильными длительное время. Необходимо учитывать, что, как правило, после вскрытия набор стабилен не более 1–2 месяцев.

Список литературы.

И. С. Балаховский / Основные правила проведения лабораторных анализов./ в кн.: «Лабораторные методы исследования в клинике». Справочник. / Под редакцией В. В. Меньшикова/ М. 1987.

В. Л. Войховский, А. Н. Алипов, А. Г. Бойцов, О. В. Егорова, Н. М. Запольская, О. Н. Литовка, А. А. Порин, Л. М. Муравник, Н. М. Сафьянников./ Техническое оснащение лабораторных исследований./ в кн.: «Медицинские лабораторные технологии». Справочник. Под ред. А. И. Карпищенко./ Т.1./ СПб, Интермедика, 1998.

Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап./ Под ред. В. В. Меньшикова./ М., 1999.

В. В. Меньшиков. / Современные возможности клинической лабораторной аналитики./ Клин. лаб. диагностика./ №3, 2000.

Клиническая лабораторная аналитика./ Под ред. В. В. Меньшикова./ Т.1./ М. Агат-Мед., 2002.

Приказ №220 МЗ РФ от 26 мая 2003 г. «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов» /В кн.: Лабораторная служба. Нормативные документы для КЛД ЛПУ./ М. МО РАМЛД, 2003.