



**ОСНОВНЫЕ ИСТОЧНИКИ ОШИБОК
ПРИ ПРОВЕДЕНИИ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

Основные источники ошибок при проведении иммуноферментного анализа

Материалы данной публикации подготовлены на основе многолетнего опыта сотрудников научно-исследовательского подразделения ООО «Хема-Медика» по разработке и выпуску Наборов реагентов для иммуноферментного определения широкого круга анализитов. Постоянные контакты с нашими заказчиками позволили выделить целый ряд типичных методических проблем, зачастую возникающих при работе с иммунодиагностическими наборами.

Мы надеемся, что данное издание будет полезно для сотрудников всех лабораторий, использующих иммунохимические методы анализа. Правильное применение содержащейся в ней информации позволит сократить количество недостоверных результатов исследований, а это, в свою очередь, благоприятно скажется на экономике лабораторного диагностического процесса и, в конечном итоге, на качестве лечения пациентов.

Введение

Лабораторные исследования в большинстве случаев служат более чувствительными и надежными показателями состояния организма человека, чем его самочувствие. Результаты анализов отражают физико-химические свойства исследуемой пробы и дают объективную диагностическую информацию в цифровом выражении. Важные решения о стратегии ведения пациента часто основаны на незначительных изменениях лабораторных данных. Именно поэтому роль лабораторных тестов, а также спектр и количество проводимых исследований, необходимых в процессе диагностики и лечения заболеваний, постоянно возрастает. Однако из практики работы любой диагностической лаборатории известно, что получаемые ими результаты далеко не всегда являются правильными. Это связано с наличием большого количества непатологических факторов, способных оказывать влияние на конечные результаты лабораторных данных.

Как показывает наш опыт работы, основное количество получаемых неудовлетворительных результатов связано с ошибками, допущенными в ходе проведения анализа. Появление случайных и систематических ошибок на любой стадии анализа будет снижать достоверность лабораторных результатов и, как следствие, затруднит постановку правильного диагноза и проведение адекватного лечения.

В данной публикации мы постарались рассмотреть наиболее распространенные причины появления погрешностей на разных стадиях лабораторных исследований и систематизировали их в соответствии с общей схемой классификации этапов лабораторного анализа, приведенной ниже.

Общая схема классификации этапов анализа

- **Преаналитический (долабораторный) этап** включает в себя все стадии от назначения анализа клиницистом до поступления исследуемого образца в лабораторию на рабочее место, а именно: назначение анализа, отбор биологического материала, его обработку и доставку в лабораторию.
- **Аналитический доприборный этап** представляет собой все стадии ручного или полуавтоматического анализа до момента регистрации результатов.
- **Приборный этап** обычно является стадией регистрации результатов, но может также включать все процедуры, которые происходят с пробой при проведении автоматических видов анализа.
- **Постаналитический этап** состоит из оформления бланка с результатами, интерпретации результатов лабораторного исследования, доведения результатов до лечащего врача и постановки диагноза. На постаналитическом этапе возможным источником ошибок может являться неправильное заполнение бланка

с результатами, а также неверная трактовка полученных данных. Впрочем, последнее имеет отношение к профессиональной компетентности врачебного персонала, и не является темой данной публикации.

Глава 1. Преаналитический этап.

Ошибки, возникающие на внелабораторном этапе анализа, составляют, в среднем, от 70% до 95% всех погрешностей, которые допускаются при проведении анализа. Именно они могут оказаться непоправимыми и полностью обесценить весь ход проводимых исследований. Поэтому правильная организация преаналитического этапа должна стать составной частью любой системы обеспечения качества лабораторного анализа.

При получении, обработке и доставке образцов в лабораторию следует иметь в виду следующие факторы, которые могут быть как устранимыми, так и неустранимыми.

1.1. Биологические факторы, связанные с личностью пациента.

Пол пациента. Для каждого пола имеются статистически значимые различия в целом ряде клиничко-химических и гематологических показателей. В частности это относится к уровням стероидных и гликопротеидных гормонов (прогестерон, эстрадиол, тестостерон, 17-ОН прогестерон, ЛГ, ФСГ, ТТГ, СТГ, пролактин), транспортных белков (ССГ, ТСГ) и других биологически активных соединений (ТГ), определяемых иммунохимическими методами. В методической литературе имеется обширная информация по этому вопросу, кроме того, ее можно найти в большинстве инструкций по применению Наборов реагентов. Однако следует отметить, что приведенные в литературе референтные интервалы следует рассматривать лишь как ориентировочные. Это связано с наличием конструктивных особенностей Наборов реагентов различных фирм-производителей, а также с региональными и расовыми различиями в составе населения. Поэтому в каждой лаборатории рекомендуется установить собственные значения нормальных уровней исследуемых показателей с использованием тех видов Наборов реагентов, которые используются в рутинной практике клиничко-диагностической лаборатории.

Возраст пациента. Концентрации целого спектра аналитов зависят от возраста пациента и могут значительно изменяться от момента рождения до старости. Наиболее ярко возрастные изменения выражены для биохимических показателей (гемоглобин, билирубин, активность щелочной фосфатазы, содержание липопротеинов низкой плотности и др.), а также для ряда аналитов, определяемых иммунохимическими методами. К ним относятся половые стероидные и гликопротеидные гормоны, тиреоиды, АКТГ, альдостерон, ренин, соматотропный гормон, паратгормон, 17-оксипрогестерон, дегидроэпиандростерон, ПСА и др. Желательно, чтобы в каждой лаборатории имелись возрастные нормы для каждого из исследуемых показателей, что позволит более точно интерпретировать полученные результаты.

Биологические ритмы. Существующие линейные хронобиологические ритмы (возраст пациента), циклические ритмы (циркадные и сезонные) и некоторые другие (менструальный цикл) могут существенно влиять на концентрации аналитов.

Циркадные ритмы аналита (т.е. изменения его концентрации в течение суток), наиболее ярко выражены для кортизола, АКТГ, альдостерона, пролактина, СТГ, ренина, ТТГ, паратгормона, тестостерона и др. Отклонения концентраций от среднесуточных значений могут достигать 50%-400% и этот фактор обязательно должен приниматься во внимание. Например, циркадный ритм кортизола может являться причиной недостоверных результатов теста на толерантность к глюкозе, если он проводится во второй половине дня.

Для того чтобы не затруднять процесс интерпретации результатов, отбор проб для анализа нужно проводить строго в определенное время суток, обычно между 9 и 11 часами утра. Следует иметь в виду, что референтные интервалы содержания большинства аналитов, приведенных в справочной литературе, установлены именно

для этого промежутка времени.

При проведении специальных исследований, например, при установлении индивидуального циркадного ритма секреции гормона, в течение суток отбирается несколько проб анализируемого материала. В документах, сопровождающих такие образцы, необходимо указать точное время взятия каждого из них.

На циркадный ритм могут накладываться **индивидуальные ритмы** - сна, еды, физической активности, которые не следует путать с действительно суточными колебаниями. Для того чтобы исключить индивидуальные ритмы при определении уровня аналитов, секретируемых порционно (соматотропин, ренин, вазопрессин, тестостерон, пролактин и др.), рекомендуется использовать смешанную пробу, полученную из нескольких (обычно двух-трех) образцов крови, взятых с интервалом в 2-3 часа. В некоторых случаях следует учитывать сезонные влияния. Например, содержание трийодтиронина (Т3) в сыворотке (плазме) крови на 20% ниже летом, чем зимой.

Беременность и менструальный цикл являются нормальными физиологическими процессами, которые сопровождаются значительными изменениями в выработке стероидных, гликопротеидных и тиреоидных гормонов, транспортных белков (ССГ, ТСГ), АКТГ, ренина, а также в целом ряде биохимических и гематологических показателей. Поэтому для правильной интерпретации результатов важно точно указать день менструального цикла или срок беременности, когда был отобран исследуемый образец крови.

При проведении скрининга врожденных пороков развития плода по биохимическим показателям следует иметь в виду, что диагностическая чувствительность и специфичность данного вида исследования в значительной степени будет определяться комбинацией выбранных иммунохимических маркеров. Она должна быть различной на разных стадиях развития плода. Например, для первого триместра беременности наиболее предпочтительным является определение АФП, свободной В-субъединицы ХГЧ и ассоциированного с беременностью белка А (РАРР-А), а для второго триместра – АФП, общего ХГЧ (часто обозначаемого как В-ХГЧ) и свободного эстриола. Все указанные виды анализов должны проводиться в строго рекомендуемые сроки беременности, а каждая лаборатория, занимающаяся скрининговыми исследованиями, должна располагать собственной постоянно обновляемой и пополняемой базой медиан уровней исследуемых маркеров для каждой недели беременности.

Физические и стрессовые нагрузки, а также **положение тела пациента** оказывают значительное влияние на содержание таких аналитов, как кортизол, тестостерон, АКТГ, ангиотензин, альдостерон, ренин, пролактин, СТГ, ТСГ, миоглобин, катехоламины, вазопрессин и др.

При анализе гормонов, концентрация которых может быстро изменяться в течение суток, например, тестостерона, рекомендуется использовать смешанную пробу, полученную из трех образцов сыворотки (плазмы) крови, отобранных с интервалом в несколько часов.

Отбор образцов крови для определения ряда аналитов, таких как альдостерон, эпинефрин, норэпинефрин, предсердный натрийуретический пептид, а также для оценки активности плазматического ренина, следует проводить в положении лежа и/или стоя при спокойном состоянии пациента. В документах, сопровождающих образцы, должна быть сделана специальная отметка о времени и условиях получения пробы.

Все специальные условия отбора исследуемых образцов, рекомендуемые для того или иного вида анализа, оговорены в методической литературе, а также в Инструкции по применению Наборов и должны неукоснительным образом соблюдаться.

Диагностические и лечебные процедуры, такие как оперативное вмешательство, диализ и внутривенные вливания, пункции, биопсии, массаж, функциональные тесты (пероральный тест на толерантность к глюкозе, стимулирующие и ингибирующие тесты для оценки функциональной активности надпочечников и гипофиза), эндоскопия, ионизирующее излучение, иммуносцинтиграфия и др. часто оказывают влияние на результаты лабораторных исследований. Например, уровень ПСА в течение нескольких дней может быть повышен после массажа простаты или катетеризации

мочевого пузыря. Любые манипуляции с молочной железой или тепловые процедуры (например, сауна) приводят к значительному возрастанию уровня пролактина. Для исключения этих факторов отбор образцов крови рекомендуется проводить до выполнения любых лечебных и диагностических процедур.

Прием лекарственных препаратов может отражаться на количественном содержании в организме целого ряда анализируемых показателей. Например, уровень ТТГ снижается при лечении допамином, концентрация общих и свободных фракций тиреоидных гормонов (ТЗ, Т4) изменяется при введении фуросемида, даназола, амиодарона и салицилатов, а применение некоторых противоязвенных препаратов может повышать уровень пролактина у мужчин. Введение моноклональных мышинных антител для проведения сцинтиграфии, при лечении опухолей или при пересадке органов может приводить к появлению в крови пациента гетерофильных антител к IgG мыши (НАМА), которые являясь фактором, искажающим результаты диагностических тестов с использованием моноклональных антител.

Присутствие лекарственных препаратов в биологическом материале, например, контрацептивов, салицилатов, андрогенов и др., может специфическим (перекрестная реакция) или неспецифическим образом (интерференция) влиять на результаты лабораторных исследований при определении концентрации стероидных и тиреоидных гормонов, а также специфических связывающих белков крови. Поэтому проведение медикаментозной терапии, могущей исказить результаты анализа, следует назначать после взятия проб крови.

При проведении лекарственного мониторинга точное время отбора образца крови является очень важным параметром для правильной интерпретации результатов исследования.

Широкий спектр лекарственной интерференции в ходе лабораторных исследований рассмотрен во многих обзорах и книгах, а также в Инструкции по применению Наборов. Чтобы исключить возможность получения ложных результатов, обусловленных применением лекарственных препаратов, рекомендуется консультироваться с клиницистами, а также использовать соответствующие электронные справочники.

Диета и потребление жидкости относятся к основным факторам, оказывающим влияние на концентрацию большинства аналитов в клинической химии, а также некоторых биологически активных соединений, определяемых иммунохимическими методами. Например, кофеин обладает способностью ингибировать расщепление ЦАМФ, повышает активность плазматического ренина и концентрацию катехоламинов. Голодание приводит к увеличению содержания в образцах сыворотки (плазмы) крови кортизола и дегидроэпиандростерон-сульфата, а бессолевая диета – к повышению уровня альдостерона в 3-5 раз.

Для таких случаев разработаны специальные рекомендации по подготовке пациента к отбору образцов крови. Например, определение активности плазматического ренина должно проводиться при стандартном потреблении K^+ и Na^+ , при этом также исключается назначение диуретиков, гипотензивных средств и β -блокаторов, ограничивается курение и прием напитков, содержащих кофеин. Взятие образцов крови для определения концентрации ряда аналитов, например, кальцитонина, паратгормона, СТГ, инсулина и С-пептида обязательно проводится натощак.

Необходимость соблюдения определенной диеты при проведении того или иного вида анализа, оговорена в справочно-методической литературе, а также в Инструкциях по применению Наборов.

1.2. Факторы, связанные с условиями отбора проб.

Место отбора образца крови – вена, артерия или капилляры, определяется процедурными аспектами, исходя из рекомендаций, имеющихся в Инструкции по применению Набора. Для проведения иммунохимических исследований основным методом отбора крови является венепункция. Для уменьшения внутри- и межиндивидуальной вариации результатов лабораторных исследований необходимым

условием является стандартизация процедуры отбора крови (соблюдение фазы отдыха и голодания, положения тела пациента, времени суток, длительности наложения жгута).

Пункция кожи на ладонной поверхности фаланги пальца или подошвенной поверхности пятки используется в тех случаях, когда необходимо отобрать небольшое количество крови у ребенка. Следует иметь в виду, что содержание анализов в венозной и капиллярной крови может существенно различаться, например, при проведении теста на толерантность к глюкозе.

Объем крови, отобранной у пациента, должен быть сведен к разумному минимуму с тем, чтобы избежать таких ее потерь, которые при часто повторяющихся исследованиях могут привести к развитию анемии. Однако количество сыворотки или плазмы, полученной из образца крови, должно превышать необходимый для анализа объем как минимум в 2-3 раза, принимая во внимание возможность проведения повторного или дополнительного исследования, а также резервирование архивных образцов.

Если анализ не будет проводиться в тот же день, рекомендуется разделить весь имеющийся анализируемый материал на 2-3 аликвоты подходящего объема, чтобы обеспечить рекомендуемые условия хранения исследуемого образца, исключить повторные циклы замораживания и оттаивания проб, а также сократить вероятность их контаминации при повторных исследованиях.

Периодичность взятия проб. Повторные взятия проб крови широко используются в динамических исследованиях, например, при проведении стимуляционных тестов, для оценки эффективности проводимого лечения, при прогнозировании исхода заболевания, при лекарственном мониторинге, а также в целом ряде других случаев. Интервалы между отбором образцов, помимо конкретных задач исследования, должны определяться с учетом следующих факторов:

- периода биологической полужизни определяемого аналита. Например, для оценки уровня ПСА в постоперационном периоде отбор образцов крови для исследования должен проводиться не ранее, чем через 10-14 дней после хирургического вмешательства;
- фармакокинетических свойств препаратов при проведении терапевтического лекарственного мониторинга. Например, забор крови для определения циклоспорина А должен производиться непосредственно перед приемом следующей его дозы, а для сердечных гликозидов – через 4 часа после введения препарата;
- динамики изменения концентрации аналита в ходе нормальных или патологических процессов (мониторинг беременности, диагностика и мониторинг опухолевых и инфекционных заболеваний и др). Обычно при этом индивидуальные колебания уровней исследуемых аналитов могут быть очень значительными (свободный эстриол, ХГЧ, АФП и др.). В этих случаях нормальные диапазоны не являются достаточно информативными для постановки диагноза. Вместо них используют значения медиан нормальных концентраций;
- при мониторинге опухолевых заболеваний, а также для оценки эффективности проводимого лечения в качестве точки отсчета используются индивидуальные базовые уровни онкомаркеров до начала терапии. Последующие заборы образцов крови проводятся через строго определенные клиницистами промежутки времени. Этот же принцип используется при диагностике и лечении инфекционных заболеваний - выявление специфических антител к возбудителю и динамика их уровней в ходе лечения.

Использование антикоагулянтов является обязательным при проведении некоторых видов анализа (ренин, АКТГ, цАМФ, катехоламины, эндорфин и др.), чтобы предотвратить быстрое разрушение этих нестабильных соединений.

Следует иметь в виду, что для ряда аналитов существует диагностически значимая разница между результатами, полученными при биохимическом или иммунологическом исследовании сыворотки и плазмы (нейрон-специфическая эналаза, тиреотропный гормон, дофамин, серотонин, некоторые виды антител и др.). Эти различия могут быть

обусловлены следующими техническими и физиологическими причинами:

- анализ может участвовать в образовании сгустка;
- анализ может высвобождаться из клеток в процессе свертывания крови;
- присутствие антикоагулянта или фибриногена может влиять на процессы, протекающие в ходе анализа (интерференция).

Метод-зависимая интерференция является наиболее частой причиной получения неадекватных результатов при иммунохимических исследованиях. Поэтому необходимо использовать рекомендуемый тип и концентрацию антикоагулянта, поскольку, оставаясь в составе анализируемой пробы, он может изменять ее физико-химические свойства и оказывать негативное влияние на протекание иммунохимической реакции, например, подавлять связывающую активность антител или ингибировать ферментативную активность конъюгата.

При проведении анализа в цельной крови (циклоспорин) взятые пробы должны быть очень тщательно перемешаны с антикоагулянтом, так как образование микросгустков будет отражаться на полученных результатах.

Температурные условия забора и последующей обработки крови очень важны при определении таких нестабильных соединений, как АКТГ, ренин, катехоламины, цАМФ, с-пептид, инсулин, проинсулин, гастрин, пепсиноген, глюкагон, соматостатин и др. Сразу же после отбора проб пробирки с кровью должны быть помещены в контейнер со льдом. Все дальнейшие процедуры – центрифугирование, отбор сыворотки и ее аликвотирование, должны проводиться быстро и при температуре, не превышающей +4°C. Полученные образцы сыворотки крови, если они сразу же не используются для анализа, должны быть немедленно заморожены. Несоблюдение этих условий может серьезно и необратимо исказить результаты исследования.

Использование ингибитора протеиназы – аprotинина (трасилола) в смеси с антикоагулянтом рекомендовано для стабилизации ферментов и гормонов белковой природы.

Гемолиз и липемия проб являются факторами риска, способными снижать достоверность результатов анализа. Это связано с тем, что в клетках крови содержится в высокой концентрации целый ряд компонентов, определяемых в сыворотке или плазме. При гемолизе они могут высвобождаться в анализируемую пробу и изменять ее состав, затрудняя интерпретацию результатов исследования.

Мутные образцы с повышенным содержанием липопротеинов и триглицеридов не рекомендуется использовать в качестве анализируемого материала для определения стероидов и других липофильных компонентов из-за снижения доступности определяемого вещества для специфических антител.

Влияние гемолиза и липемии на результаты исследований представляет собой метод-зависимую интерференцию, поэтому лаборатории должны обращать самое пристальное внимание на соответствующие сведения, приведенные в Инструкциях по применению Наборов, а также в методической литературе. Кроме того, стандартизация преаналитического этапа (использование стандартных игл, закрытых пробирок, калиброванных центрифуг, соблюдение рекомендованных температурных и временных режимов обработки проб и т.д.) позволит значительно снизить риск получения некачественного аналитического материала.

Из специальных рекомендаций следует отметить, что при заборе крови для определения АКТГ рекомендуется использовать пробирки из полистирола, т.к. стекло адсорбирует этот гормон.

При определении β2-микроглобулина в моче следует учитывать pH образца, т.к. данный белок быстро разрушается в щелочной среде.

1.3. Идентификация проб.

Правильная и четкая маркировка пробирок является важнейшей задачей преаналитического этапа, так как позволяет исключить путаницу при идентификации имен пациентов, запросов на пробы, самих проб и результатов исследований. Наиболее

часто для идентификации личности пациента используют его фамилию, имя и дату рождения.

Вся основная информация о пациенте вместе с назначением определенного спектра лабораторных тестов должна присутствовать в специальной форме запроса, который может быть связан с пробой только номером или кодом.

Сразу же при поступлении в лабораторию проба пациента должна быть идентифицирована. Для уменьшения количества используемой информации пробиркам с пробам и их аликвотам присваивается индивидуальный номер пациента, который, в идеале, должен присутствовать на любом запросе, пробе или бланке с результатами исследования. Обычно это делается вручную, что создает проблему механического перепутывания проб и других случайных ошибок, допускаемых лабораторным персоналом при значительном объеме исследований. Данная проблема может быть решена с помощью электронных средств переноса информации и ее последующей машинной обработки, например, штрих-кода.

Анализ любой пробы, чья принадлежность или происхождение недостаточно документированы, должен быть приостановлен до получения недостающей информации.

1.4. Транспортировка проб в лабораторию.

Подготовленный и промаркированный биологический материал должен быть как можно быстрее доставлен в лабораторию. Следует иметь в виду, что упущения при транспортировке, нарушающие сохранность проб, делают невозможным правильное определение концентрации аналита.

Для пересылки проб следует использовать герметически закрывающиеся пробирки из инертного небьющегося материала. Пробирки должны быть помещены в специальный контейнер с абсорбентом, который снижает риск протекания при каком-либо механическом повреждении и обеспечивает необходимые меры безопасности для людей и окружающей среды. При транспортировке охлажденных или замороженных образцов рекомендуется использовать теплоизолирующий контейнер из пенопласта, в который можно поместить сухой лед или охлаждающие элементы. Особого температурного режима (+4°C) требует пересылка проб, предназначенных для определения таких лабильных аналитов, как АКТГ, инсулин, С-пептид, ренин, СТГ, альдостерон.

В некоторых случаях для анализа используются пробы сухих пятен крови на фильтровальной бумаге (циклоспорин, неонатальный ТТГ). Пересылка таких образцов может осуществляться по почте без соблюдения особых температурных условий. Единственным требованием является надежная упаковка проб, с тем, чтобы обеспечить их сохранность в процессе доставки, а также исключить контакт с потенциально инфекционным материалом.

1.5. Первичная обработка проб.

Желательно, чтобы пробы цельной крови были доставлены в лабораторию не позднее, чем через 45 минут после отбора, а их обработка [центрифугирование, отделение сыворотки (плазмы) от осадка и ее аликвотирование] должна быть завершена в течение 1 часа после забора крови. Это необходимо для обеспечения сохранности тех аналитов, которые быстро разрушаются даже при +4°C, особенно, если сыворотка не отделена от сгустка крови (С-пептид).

Обработанные образцы сыворотки (плазмы) крови должны сразу же использоваться для проведения анализа. В противном случае их нужно заморозить при температуре -20°C. В таком виде их можно хранить в течение некоторого времени, оговоренного в Инструкции по применению Набора.

Таким образом, **контролируемыми параметрами преаналитического этапа** являются подготовка пациента, отбор анализируемого материала, идентификация проб и их первичная обработка, использование консервантов, а также транспортировка и хранение исследуемых образцов до проведения анализа.

Персонал лаборатории должен хорошо представлять себе требования к долабораторному этапу и тщательно их соблюдать. Это должно являться правилом при проведении любых видов анализа, как биохимического, так и иммунохимического.

Следует еще раз отметить, что основная информация и специальные требования по проведению долабораторного этапа имеются в Инструкциях по применению Наборов, а также в специальной методической литературе.

Глава 2. Аналитический этап.

Основные причины появления погрешностей на данном этапе могут носить как объективный, биологический, так и субъективный характер, связанный с допущением лабораторных ошибок.

2.1 Плохая организация работы в лаборатории является фактором, приводящим к увеличению числа случайных ошибок, допускаемых персоналом при проведении анализа (неправильный отбор проб, ошибочное внесение компонентов не в те лунки, пролив реагентов и их загрязнение, несоблюдение рекомендуемых временных интервалов и т.п. и условий хранения исследуемых образцов и Наборов реагентов).

Лабораторное помещение должно соответствовать требованиям, изложенным в соответствующих ведомственных инструкциях, а также быть приспособленным для проведения лабораторного микроанализа. Последнее подразумевает, в том числе, отсутствие общей загроможденности, наличие достаточного количества места для проведения анализа, а также оптимальное расположение приборов и лабораторного оборудования.

Специфическим и очень важным требованием для проведения иммуноферментного, а также любого иммунохимического анализа, является оптимальная температура в помещении (+18-25°C). Следствием работы при более низкой (высокой) температуре может быть значительное изменение регистрируемой оптической плотности растворов в лунках, ухудшение чувствительности метода, сокращение диапазона определяемых концентраций и, как следствие, получение искаженных результатов анализа.

Существует несколько механизмов изменения аналитических характеристик Наборов реагентов в зависимости от температуры, при которой проводится эксперимент: нарушение иммунохимического равновесия, изменение скорости развития окраски, подсыхание растворов и образование солево-белкового «ободка» на внутренней поверхности лунок планшета при высокой температуре и низкой влажности воздуха в помещении и др. Попытки скорректировать влияние температуры на результаты анализа путем изменения времени инкубации далеко не всегда бывают успешными, особенно если состав калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов имеет значительные различия. Поэтому единственно правильным решением будет проведение инкубации в термостате, установленном на комнатную температуру (+18-25°C), если в помещении холодно, и отмена анализа – если слишком жарко.

Категорически запрещается инкубировать планшеты вблизи нагревательных приборов, так как при этом температура в разных лунках будет различной, а изменения результатов анализа станут непредсказуемыми.

Наличие хорошей вытяжной вентиляции является важным условием при работе с иммуноферментными наборами, так как в их состав входят вещества (ОФД, ТМБ, растворы кислот, ртутьсодержащие консерванты, антибиотики, а также аэрозоли используемых реагентов), представляющие определенную опасность для лабораторного персонала. Кроме того, в некоторых методиках присутствуют стадии экстракции анализируемого вещества органическими растворителями.

2.2 Ошибки, связанные с лабораторным оборудованием.

При использовании нестандартизованного лабораторного оборудования, а именно,

дозировующих устройств, термостатов, спектрофотометров, могут появляться ошибки, имеющие систематический или случайный характер.

Дозаторы. Неправильное дозирование растворов при проведении микроанализа критическим образом сказывается на полученных результатах. Поэтому не реже одного раза в месяц (лучше еженедельно) необходимо проводить проверку работы дозаторов на точность и сходимость результатов пипетирования, например, весовым методом. Допустимая погрешность пипеток не должна превышать 5%.

Промывающее устройство для планшет. Распространенным источником получения ошибочных результатов является плохая работа промывающего устройства, которая заключается в неравномерном заполнении лунок отмывочным раствором и/или его неполном удалении.

Наиболее частой причиной нарушения работы автоматического или ручного промывающего устройства является засорение одного из его каналов кристаллами солей буферного раствора, или другими крупными взвешенными частицами. Возникающая при этом недостаточная промывка, т.е. неполное удаление непрореагировавших компонентов (особенно конъюгата) приводит к увеличению сигнала в определенном ряду лунок (или в одной и той же лунке при использовании 96-канального промывателя) на разных планшетах. Несмотря на кажущуюся простоту выявления такой ошибки, необходимо исключить возможность появления аналогичной картины, связанной с неисправностью промывающего устройство.

Иногда нарушается подача/аспирация растворов из-за засорения внутреннего канала промывающего устройства между иглами. Это приводит к частичному переносу реагентов из одной лунки в другую. При этом в лунках, соседних по ряду с сильноокрашенными образцами, также будет наблюдаться повышенная оптическая плотность, снижающаяся по мере удаления от исходной лунки.

Желательно, чтобы в процессе промывки лунки полностью заполнялись раствором. Это способствует более полному удалению следов сыворотки и конъюгата с их внутренних боковых поверхностей.

Засорение входного фильтра, пророст в шлангах и другие причины, препятствующие свободному передвижению жидкости, также приводят к сбоям в работе промывающего устройств. Поэтому необходимо ежедневно визуально контролировать качество (однородность) заполнения лунок и удаления растворов. В конце рабочего дня необходимо тщательно промыть устройство дистиллированной водой. Это предотвратит кристаллизацию солей в каналах промывателя и снизит вероятность пророста в подающих и выпускных шлангах.

Спектрофотометр. Одной из распространенных причин получения неправильных результатов является измерение оптической плотности без достаточного предварительного прогрева прибора. При этом его погрешность будет значительно превышать допустимую. Ввиду конструктивных особенностей некоторых спектрофотометров точность измерения может заметно снижаться при оптической плотности свыше 2,5-3,0 о.е.

Качество работы спектрофотометра можно оценить путем повторного измерения оптической плотности лунок в одном и том же планшете. При проведении повторного измерения желательно развернуть планшет на 180°. Допустимым является отклонение результатов измерения оптической плотности в одной и той же лунке, не превышающее 2%.

Следует иметь в виду, что изменение оптической плотности содержимого лунок может быть вызвано наличием капель, царапин, отпечатков пальцев и других загрязнений на дне лунок. Поэтому перед проведением регистрации результатов их следует аккуратно протереть 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 снижению регистрируемой оптической плотности. Ошибка легко выявляется при визуальной оценке результатов и их сравнении с распечаткой оптической плотности лунок.

Термостат. При использовании термостата необходимо контролировать температуру на верхней и нижней его полке с помощью дополнительного контрольного термометра. Для исключения подсыхания лунок во время длительной инкубации рекомендуется использовать влажную камеру, или заклеивать лунки специальной бумагой для заклеивания планшетов, входящей в комплект Набора реагентов.

Прибор для встряхивания планшетов (шейкер) необходим в тех случаях, когда, согласно протоколу анализа, одна или несколько его стадий должны проводиться при постоянном встряхивании. Соблюдение рекомендуемой частоты кругового перемешивания растворов в лунках обеспечивает оптимальные условия протекания иммунохимической реакции и способствует получению воспроизводимых результатов. При слишком интенсивном встряхивании может происходить десорбция иммобилизованных на планшете реагентов, а также выплескивание растворов из лунок. При недостаточном перемешивании, а также при инкубации без встряхивания будет наблюдаться заметное снижение оптической плотности, а в некоторых Наборах возможно получение ложных результатов. Следует иметь в виду, что продление времени инкубации далеко не всегда может компенсировать отсутствие встряхивания.

Автоматический анализатор. В крупных лабораториях, выполняющих значительное количество исследований, часто используются автоматические ИФА-анализаторы, которые позволяют значительно сократить трудозатраты на исполнение анализа. В состав таких автоматов входят узлы, обеспечивающие проведение всех стадий анализа, т.е. предварительное разведение исследуемых образцов, внесение реагентов, инкубацию, отмывку и спектрофотометрию лунок. Появление систематических проблем при автоматизированном проведении того или иного вида анализа и исчезающих при ручном его исполнении, может быть связано со сбоями в работе одного из узлов анализатора (дозировющего устройства, блоков отмывки лунок и встряхивания планшетов, спектрофотометра или термостата). Такие погрешности, относящиеся к разряду технических, достаточно легко выявить и устранить. Однако существует другая причина систематического получения ошибочных результатов. Некоторые виды анализаторов из-за своих конструктивных особенностей не способны обеспечить одинаковую продолжительность инкубации для всех лунок планшета. Иногда разница во времени внесения компонентов в первую и последнюю лунку может достигать 18 минут, что неизбежно приведет к дрейфу полученных результатов и будет особенно заметно в анализах, протоколы которых предусматривают короткую инкубацию. Наличие дрейфа можно выявить с помощью контрольной пробы, которую вносят в первую после лунок с калибровочными пробами, в центральную и в последнюю лунку используемого планшета.

Лабораторная посуда. Посуда для приготовления рабочих растворов реагентов должна быть тщательно вымыта. Особенно это касается раствора субстрата и конъюгата, так как даже следовые загрязнения синтетическими моющими средствами и окисляющими реагентами могут сказаться на результатах анализа. Рекомендуется выделить и промаркировать отдельную посуду, дозаторы и использовать одноразовые наконечники для работы с растворами конъюгата и раствора субстрата (ТМБ).

Фильтровальная бумага, на которой простукивают планшет для удаления мелких капель отмывочного раствора, должна использоваться однократно.

2.3. Ошибки при подготовке образцов к анализу.

Размораживание. Если исследуемые образцы поступают в лабораторию в замороженном виде, их необходимо разморозить при комнатной температуре (+18-25°C) и тщательно перемешать на вихревом или ротационном смесителе для разрушения градиента концентрации сывороточных компонентов, образующегося при размораживании. Следует иметь в виду, что неполное перемешивание размороженных проб является очень частым источником ошибок.

Центрифугирование. Перед проведением анализа необходимо визуально убедиться в гомогенности используемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Присутствие в исследуемом образце сыворотки (плазмы) крови сгустков фибрина, осадка или взвешенных частиц может помешать точному отбору пробы дозатором. В таких случаях необходимо провести центрифугирование пробы и отобрать супернатант для исследования.

Образцы сыворотки (плазмы) крови с признаками микробиологического пророста (неприятный запах, плесневые вкрапления, комковатый осадок и мутность) для анализа использовать нельзя из-за произошедшего в них ряда серьезных биохимических изменений.

Разведение исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. В некоторых видах анализа предусматривается стадия предварительного разведения исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Отбор каждого образца и приготовление его серийных разведений должны проводиться отдельными одноразовыми наконечниками, что исключает незапланированный перенос анализируемого материала из одной пробы в другую. Это имеет принципиальное значение при определении ряда аналитов, уровень которых значительно колеблется в различных пробах (например, ХГЧ, аутоантитела и др.).

Следует иметь в виду, что плотность сыворотки отличается от плотности буферных разбавителей, поэтому приготовленные разведенные пробы необходимо тщательно перемешать перед проведением анализа или для приготовления последующих разведений. Перемешивание проб должно проводиться аккуратно, без избыточного вспенивания, так как это может привести к разрушению лабильных аналитов.

Если разведение проб проводится в лунках микропланшета, то его нельзя использовать повторно. Для этих целей также исключается использование планшетов с сорбированными антителами или антигенами.

2.4. Ошибки при подготовке компонентов Набора к работе.

Наиболее удобным для потребителя является использование таких наборов реагентов, в которых все компоненты полностью готовы к использованию. Однако зачастую большая или меньшая часть реагентов, входящих в состав ИФА-наборов, требует подготовки к анализу.

Растворение и разбавление реагентов.

Дистиллированная вода. Качество дистиллированной воды, используемой для растворения и разбавления компонентов набора реагентов, играет важную роль в получении воспроизводимых и достоверных результатов. Например, приготовление отмывочного раствора на воде с примесью хлора и имеющей pH около 4,0 может приводить к десорбции иммобилизованных антител или антигена, снижать сигнал и увеличивать вариабельность результатов, т.е. ухудшать аналитические параметры набора реагентов. С этой проблемой наиболее часто приходится сталкиваться осенью и весной, что связано с ухудшением качества водопроводной воды.

Дистиллированную или деионизованную воду, используемую для приготовления реагентов, нельзя хранить в металлических емкостях, так как загрязнение раствора субстрата ионами металла может привести к его порче.

При длительном стоянии дистиллированной воды может наблюдаться образование бактериального осадка на дне и стенках емкостей, используемых для ее хранения. Поэтому желательно готовить свежие порции дистиллята каждые 2-3 дня. Для предотвращения пророста воды нельзя использовать азид натрия и другие консерванты.

Лиофилизованные препараты и компоненты наборов. При растворении лиофилизованных компонентов набора следует убедиться в отсутствии сухих частиц препарата на герметизирующей пробке, чтобы избежать его потерь при вскрытии флакона. Необходимо обеспечить точное внесение рекомендуемых объемов растворителя для сохранения предусмотренных производителем концентраций реагентов.

Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). Для отбора раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) нельзя использовать посуду и наконечники, которые когда-либо находились в контакте с о-фенилендиамином (ОФД), так как это приведет

к получению неправильных результатов.

Отмывочный раствор. Приготовленный к работе отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18-25°C) не более 5 суток или при температуре +2-8°C не более 30 суток. Рекомендуется готовить свежие порции отмывочного раствора, которые можно полностью израсходовать в день проведения анализа. При этом исключается появление бактериального пророста, являющегося причиной засорения каналов и шлангов промывающего устройства, а также обеспечивается сохранность исходных свойств раствора.

Таким образом, наиболее предпочтительным является выбор таких Наборов реагентов, все компоненты которых поставляются в готовом к использованию виде.

Температура реагентов. Во всех Инструкциях по применению Наборов реагентов указано, что перед проведением анализа все компоненты Набора, а также используемые разбавители должны быть прогреты до комнатной температуры (+18-25°C). Внесение в лунки планшета холодных реагентов с очень большой вероятностью приведет к получению неадекватных результатов, особенно в методиках с короткой инкубацией из-за нарушения процесса установления равновесия в системе. Кроме того, вскрытие охлажденных флаконов с лиофилизированными препаратами, а также пакетов с планшетами может привести к их порче из-за конденсации влаги.

2.5. Нарушение правил хранения и использования подготовленных к работе компонентов Набора.

Калибровочные пробы и контрольная сыворотка. Калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2-8°C не более 2 месяцев. Длительное стояние на рабочем столе открытых флаконов с калибровочными пробами и контрольной сывороткой может приводить к искажению результатов анализа из-за испарения или адсорбции влаги и изменения концентрации реагента. Это особенно заметно при дробном использовании Набора для проведения 4-5 циклов определений, когда остатки калибровочных проб и контрольной сыворотки во флаконах не превышают 100-200 мкл. Как правило, концентрация аналита в них становится заметно более высокой. Поэтому сразу же после использования флаконы с калибровочными пробами и контрольной сывороткой следует закрыть крышками и поместить их в холодильник (или заморозить в аликвотах, если это указано в Инструкции по применению Набора).

Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). При хранении на свету, а также при контаминации раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) окислителями и ионами металлов может наблюдаться его самопроизвольное окрашивание в голубой и синий цвета. Такой реагент нельзя использовать для проведения анализа из-за повышения фона, снижения чувствительности и диапазона определяемых концентраций аналита. Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2-8°C в течение всего срока годности Набора;

Планшет с иммобилизованными антителами или антигеном. Основной причиной порчи лунок с иммобилизованными антителами или антигеном является повышенная влажность. Поэтому оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить в оригинальной упаковке при температуре +2-8°C в течение всего срока годности Набора.

Стабильность вскрытого Набора. Дробное использование Наборов со стрипованными планшетами является допустимой процедурой при их рутинном использовании. Тем не менее, следует иметь в виду, что реальный срок годности вскрытых Наборов неизбежно снижается. При дробном использовании Набора для проведения 4-5 циклов определений значительно возрастает вероятность случайной порчи входящих в него реагентов (пророст и испарение калибровочных проб и контрольной сыворотки, контаминация конъюгата, изменение связывающей способности лунок под действием влаги и т.д.), которую производитель просто не состоянии предусмотреть и предотвратить. Типичной проблемой в таких случаях становится также нехватка

реагентов, особенно калибровочных проб, контрольной сыворотки и конъюгата, а анализ калибровочных проб при этом вынужденно проводится в монопликатах. Все это противоречит обеспечению системы контроля качества и снижает точность определения. Поэтому в каждой лаборатории желательно экспериментально уточнить возможность дробного использования того или иного Набора, а также сократить до разумного минимума количество циклов повторных определений с использованием вскрытых Наборов.

Для обеспечения стабильности подготовленных к работе компонентов и исключения их перекрестного загрязнения следует соблюдать определенные меры предосторожности, а именно, использовать новые одноразовые наконечники, сократить пребывание реагентов на рабочем столе на свету, при комнатной температуре, особенно в открытых флаконах, а также строго соблюдать рекомендуемые условия их дальнейшего хранения.

Срок годности Набора. Использование Наборов с истекшим сроком годности является достаточно частым нарушением, встречающимся в отечественных лабораториях. Однако следует иметь в виду, что в этом случае фирма-изготовитель не может гарантировать сохранение качества своей продукции и достоверность получаемых заказчиком результатов.

Замораживание компонентов. Случайное замерзание конъюгата при транспортировке или при хранении Набора приводит к резкому снижению его ферментативной активности и падению сигнала. В то же время, однократное замораживание калибровочных проб и контрольной сыворотки нередко является допустимой, а иногда и рекомендуемой процедурой, используемой для продления срока их хранения, что в обязательном порядке оговаривается в Инструкции по применению Набора.

Выпадение солей из концентратов буферных растворов при низкой температуре является обратимым процессом и обычно не отражается на качестве данного реагента.

Для уточнения возможности хранения тех или иных компонентов Набора в замороженном виде, необходимо свериться с Инструкцией по применению Набора.

2.6. Ошибки при проведении анализа.

Случайные ошибки при внесении компонентов в лунки планшета. При проведении анализа могут наблюдаться случайные ошибки, допускаемые оператором (использование реагентов, не входящих в состав данного Набора, нарушение последовательности внесения реагента, дозирование неправильных объемов, двойное внесение реагента или образца в одну лунку, отсутствие нужного реагента или образца в лунке и т.п.). Такие ошибки не носят систематического характера и не воспроизводятся в последующих экспериментах.

Для того чтобы свести к минимуму количество случайных ошибок, необходимо визуально контролировать процесс внесения реагентов. При обнаружении ошибок испорченные лунки нельзя опорожнять и использовать заново. Их следует забраковать и провести анализ повторно.

Необходимая точность внесения реагентов обеспечивается использованием стандартизованных и поверенных дозаторов, а также достаточным практическим опытом лабораторного персонала. Результаты анализа, их точность и воспроизводимость не должны зависеть от того, кто из операторов выполняет анализ в данный день.

При использовании одноканального дозатора следует использовать новый наконечник для каждого образца, а при использовании многоканального дозатора – новые наконечники для каждого реагента.

Проведение анализа в монопликатах очень часто используется лабораториями для снижения стоимости одного исследования. Тем не менее, это не согласуется с принципами организации системы контроля качества лабораторных исследований, так как является значимым фактором риска получения неправильных результатов. При анализе калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов

в монопликатах невозможно оценить реальную вариабельность получаемых данных, а также провести выбраковку неправильных или сомнительных результатов из большого массива. Анализ неизвестных образцов рекомендуется всегда проводить в дубликатах, чтобы иметь возможность повторить исследование при наличии разброса результатов для одной и той же пробы.

Перерывы в процессе внесения реагентов. Все работы по внесению реагентов в лунки должны проводиться ритмично и без больших перерывов. Например, если калибровочные пробы находятся уже в лунках, а анализируемые образцы еще не готовы, или вносятся партиями через определенные промежутки времени, то продолжительность инкубации для разных проб будет различной. Это приведет к изменению параметров связывания и искажению результатов. Желательно, чтобы время заполнения планшета каждым из последующих реагентов было максимально коротким (не более 2 минут) и примерно одинаковым.

Нельзя оставлять незаполненными реагентами лунки в перерывах между различными стадиями анализа. Даже незначительное их высушивание, которое к тому же происходит в таких условиях неравномерно, может привести к неконтролируемому снижению сигнала. При вынужденных перерывах в работе можно на некоторое время положить планшет вверх дном на смоченный водой лист фильтровальной бумаги.

Отмывка лунок планшета. Оптимизация процесса отмывки лунок планшета является очень важным условием для получения воспроизводимых результатов. При использовании промывающего устройства следует иметь в виду, что слишком сильный вакуум при аспирации может подсушивать лунки, повреждать белковое покрытие и вызывать инактивацию фермента, а слишком слабый – оставлять в них капельки жидкости.

При любом способе отмывки необходимо визуально контролировать равномерность заполнения лунок и полноту удаления отмывочного раствора. Удаление остаточных капель жидкости является необходимой процедурой, которую проводят постукиванием перевернутого планшета по расстеленному листу фильтровальной бумаги.

Слишком долгое пребывание отмывочного раствора в лунках, а также увеличение количества циклов отмывки может приводить к падению сигнала и повышению вариабельности результатов.

Стадия инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). При проведении этой стадии необходимо строго соблюдать температурные и временные интервалы, рекомендованные производителем Набора реагентов.

Категорически нельзя сокращать продолжительность инкубации для уменьшения количества ложноположительных результатов, так как при этом невозможно выявить и устранить истинную причину их появления. Кроме того, это приводит к возрастанию числа ложноотрицательных результатов.

Инкубация с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) должна проводиться в темноте для того, чтобы избежать краевых эффектов на планшете.

Регистрация результатов. Последней стадией анализа является регистрация результатов, т.е. **приборный этап**. Измерение оптической плотности растворов в лунках должна проводиться своевременно, т.е. не позднее, чем через 15 минут после внесения стоп-реагента. Это связано с тем, что реакция окисления хромогена после внесения кислоты до конца не останавливается, а оптическая плотность растворов в лунках продолжает возрастать.

Таким образом, **контролируемыми параметрами аналитического лабораторного этапа являются:** дозирование реагентов, процессы, связанные с проведением реакции (перемешивание, термостатирование, продолжительность инкубации и т.д.), а также стадия регистрации и математической обработки результатов.

Рекламации. Как уже было сказано выше, основная часть проблем при работе с наборами реагентов, связана с ошибками, возникающими на долабораторном и аналитическом этапах. Тем не менее, иногда в лабораторию могут поступать Наборы реагентов, которые изменили свои свойства в процессе их доставки потребителям. Эта проблема характерна для отдаленных регионов, куда продукция поступает с нарушением

температурных и временных условий транспортировки (заморозка и оттаивание реагентов или нагревание их до недопустимо высокой температуры и др.).

Иногда встречаются нарушения в комплектации Набора, а также повреждение его внешней/внутренней упаковки и флаконов с реагентами. Все это является поводом для оформления рекламации на Набор.

Для того чтобы технологи фирмы могли провести анализ причин получения неудовлетворительных результатов, желательно, чтобы при оформлении рекламации заказчик предоставил распечатку с полученными данными и сохранил остатки Набора. После рассмотрения полученных материалов фирма принимает решение о замене Набора, или дает заказчику необходимые рекомендации по методике проведения анализа.

Подробную информацию об оформлении рекламации и её обработке Вы можете получить на сайте www.xema.ru или по телефону (495) 737-39-36.

Глава 3. Мероприятия по обеспечению качества лабораторных исследований.

3.1. Выбор фирмы-производителя ИФА-Наборов.

Качество лабораторных исследований в значительной мере зависит от качества реагентов, используемых для проведения анализа. И хотя при этом цена Набора не должна являться определяющим фактором при выборе того или иного вида продукции, в реалиях лабораторной практики себестоимость исследования является важным фактором выбора продукции того или иного производителя.

Желательно, чтобы в состав используемых Наборов входила контрольная сыворотка, а калибровочные пробы были аттестованы по международным стандартам анализа. Это является залогом получения сопоставимых результатов в разных лабораториях, работающих разными методами.

В состав Набора должны входить все необходимые реагенты, включая разбавитель для исследуемых образцов, желательно, в готовом к использованию виде. Это исключает вероятность получения неправильных результатов из-за использования реагентов собственного приготовления.

Стабильность реагентов после вскрытия Набора является очень важным фактором, гарантирующим получение воспроизводимых результатов. Срок годности вскрытого Набора должен быть указан в Инструкции по применению Набора. Тем не менее, возможность дробного использования того или иного вида продукции должна быть экспериментально подтверждена в каждой конкретной лаборатории.

Методика проведения анализа должна быть простой и не требующей специальной подготовки лабораторного персонала.

Выбранный Набор должен обладать высокой специфичностью и широким диапазоном определяемых концентраций. Это позволяет исключить стадии экстракции/хроматографии и предварительного разведения исследуемых образцов, которые неминуемо усложняют методику анализа и являются дополнительным источником ошибок.

Высокая чувствительность метода является необходимым условием для точного определения низких концентраций аналита (ТТГ, эстрадиол, свободные формы стероидных и тиреоидных гормонов). В тоже время она создает определенные препятствия при анализе исследуемых образцов с высоким содержанием аналита (например, ТТГ и 17-ОН-прогестерон в крови новорожденных). Поэтому для таких видов исследований необходимо выбирать специально сконструированные Наборы с более низкой чувствительностью и широким диапазоном определяемых концентраций.

Так как любой диагностический метод имеет свои ограничения, не существует Наборов, обладающих 100% диагностической чувствительностью и специфичностью. Поэтому желательно провести сравнение результатов, полученных с использованием Наборов от разных фирм-производителей, и выбрать из них те, которые в наибольшей мере соответствуют всем требованиям, предъявляемым к диагностической продукции,

исходя из спектра задач, имеющегося оборудования и квалификации персонала данной лаборатории.

3.2. Оснащенность лабораторий и их аккредитация.

Использование современного оборудования, а также поставка в лабораторию качественных реактивов и контрольных материалов играют ключевую роль в поддержании качества лабораторных исследований и позволяют обеспечивать диагностический процесс на уровне мировых стандартов. Проблема работы на устаревшем оборудовании является актуальной для всех клинических лабораторий, в том числе, работающих с методами ИФА.

В связи с возрастающим международным сотрудничеством важной задачей является унификация процесса обеспечения качества аналитических исследований. Для этих целей в России разработан Приказ МЗМП РФ №233 от 05.06.96 «Об аккредитации клинико-диагностических лабораторий в качестве экспертных». В нем содержится описание системы аттестации и признания компетентности наиболее оснащенных современной лабораторной техникой клинико-диагностических лабораторий для использования их в качестве опорных в системах стандартизации, метрологического обеспечения и межлабораторного контроля качества. Аккредитованные лаборатории также призваны оказывать помощь в решении спорных вопросов при оценке результатов, полученных тем или иным методом.

3.3. Внутри- и межлабораторный контроль качества.

Внутрилабораторный контроль качества представляет собой систему мероприятий, направленных на контроль и стандартизацию всех этапов лабораторного анализа, а также на устранение причин, приводящих к получению неудовлетворительных результатов.

Система внутреннего контроля должна быть связана с системой внешнего контроля, которая обеспечивает сопоставимость результатов, получаемых в разных лабораториях, а также оценивает их соответствие международным стандартам, включая референтные.

Правильно организованная система внутреннего контроля качества позволяет эффективно выявлять и устранять ошибки, связанные с **внешними изменяющимися факторами** (разные виды и серии реагентов, калибровочные пробы и контрольная сыворотка и расходные материалы), а также с **внутренними факторами** (использование реактивов собственного изготовления, квалификация персонала, неисправности оборудования, ведение документации, организация работы в лаборатории и т.п.).

Критерии качественного измерения регламентируются ГОСТ 16263-70 и включают в себя следующие основные показатели:

Точность определения, которая характеризует качество измерений и отражает близость их результатов к истинному значению измеряемой величины. Высокая точность возможна только в том случае, когда все виды погрешностей, включая случайные и систематические, близки к нулю. Точность используемого в лаборатории метода можно установить сравнением полученных результатов с референтными методами, которые воспроизводятся в специальных аккредитованных лабораториях. При отсутствии референтных лабораторий в рутинной лабораторной практике можно рассчитать коэффициент корреляции результатов, полученных с исследуемым видом Наборов в сравнении с аналогичными Наборами более высокого класса.

Правильность определения отражает близость к нулю систематических погрешностей, т.е. соответствие среднего значения результатов измерения истинной величине определяемого параметра. Правильность определения выражается в виде разности между средним значением параметра в серии повторных измерений и истинным значением измеряемой величины.

Сходимость результатов отражает качество измерений, выполненных в одних условиях (например, в одной серии экспериментов), т.е. вариацию результатов внутри анализа.

Воспроизводимость определения отражает качество измерений, выполненных в разных условиях – межанализную вариацию. Различают воспроизводимость в одной

серии экспериментов (сходимость), во времени (день ото дня) и межлабораторную воспроизводимость результатов.

Причин плохой воспроизводимости и сходимости может быть несколько, однако все они связаны со случайными ошибками в ходе анализа.

Воспроизводимость результатов можно выразить в виде стандартного отклонения или коэффициента вариации результатов повторных измерений одной и той же пробы.

Главными аналитическими характеристиками используемой методики являются ее воспроизводимость и правильность.

Контрольные материалы. Важнейшей составляющей для правильной организации системы контроля качества являются контрольные материалы, т.е. материалы, используемые для проведения внутреннего и внешнего контроля качества результатов анализов. Контрольный материал подлежит анализу в соответствии с той же процедурой, что и исследуемый материал.

Контрольные материалы могут быть **аттестованными**, т.е. с известным содержанием определяемого вещества, измеренным наиболее широко применяемыми методами, включая референтные. Такие материалы используются для проведения как внутреннего, так внешнего контроля качества. **Неаттестованные** контрольные материалы, т.е. материалы с неизвестным содержанием аналита, являются более дешевыми и могут с успехом использоваться для контроля воспроизводимости получаемых результатов.

Основными требованиями к контрольному материалу являются следующие:

- гомогенность и минимальная вариация результатов от одной фасовки препарата к другой в пределах одной серии;
- наличие нескольких (минимум двух: норма/патология) пределов концентраций по всем исследуемым параметрам. Оптимальным является использование таких контрольных материалов, в которых значения концентраций приближены к критическим с точки зрения интерпретации результатов, например, к верхним или нижним значениям нормы;
- доступность в значительном количестве одной серии. Желательно, чтобы в лаборатории имелся запас одной серии контрольного материала не менее чем на год интенсивной работы;
- хорошая растворимость лиофилизованного препарата;
- высокая стабильность исследуемых аналитов, содержащихся в контрольном материале;
- удобство и простота в использовании;
- матрикс, на котором произведен контрольный материал, должен как можно точнее соответствовать составу биологического материала, используемого для анализа. Для различных видов исследований необходимо использовать только те виды контрольных материалов, которые имеют соответствующий матрикс (сыворотка крови человека, моча, СМЖ);
- содержание измеряемых аналитов должно быть измерено референтными методами, а также максимальным количеством существующих методов. Контрольные материалы могут быть коммерческими, или приготовленными в лаборатории самостоятельно.

Коммерческие контрольные материалы выпускаются в жидком, или лиофилизованном виде.

Являясь высокотехнологичным продуктом, коммерческие контрольные материалы имеют достаточно высокую стоимость, однако их достоинством является широкий выбор аналитов, стабильность, хорошая стандартизация референтных интервалов по всем анализируемым параметрам с использованием соответствующих методов.

Контрольные материалы собственного изготовления широко используются в лабораториях ввиду их доступности. Наиболее распространенным видом такого материала являются сливные сыворотки, приготовленные из остатков исследованных в лаборатории образцов, за исключением проб, могущих содержать инфекционные агенты (ВИЧ, гепатит), а также проб с гемолизом и липемией. Профильтрованные

и разлитые в пробирки небольшого объема, сливные контрольные сыворотки можно хранить при -20°C и использовать их для ежедневного контроля воспроизводимости результатов, получаемых в лаборатории.

Принципы проведения внутреннего контроля качества. Поскольку большинство аналитических методов используется в лаборатории ежедневно, то и внутренний контроль качества должен проводиться ежедневно. При проведении внутрилабораторного контроля качества предполагается надзор за всеми процедурами лабораторного исследования на всех его этапах, начиная от подготовки пациента и заканчивая интерпретацией результатов анализа в клинике, т.е. на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах.

Для проведения контроля качества периодически, например, один или два раза в день, или после каждых 20-40 проб пациентов и т.д., проводится измерение одного и того же контрольного материала. Полученные результаты этих измерений заносятся в специальную контрольную карту.

Наиболее распространенными **контрольными критериями** оценки приемлемости результатов являются следующие:

- Не более 5% результатов, т.е. каждая 20-я проба, выходят за пределы доверительного интервала $+2\sigma$ ($n > 20$);
- Не менее двух третей результатов лежат в пределах $+1\sigma$ и более или менее равномерно расположены по обе стороны от среднего значения измеряемой величины;
- Результаты, выпадающие за пределы $+3\sigma$, не превышают 0,25% от общего количества измерений.

Предупредительными критериями при оценке качества измерений являются следующие:

- Один результат из серии вышел за пределы $+2\sigma$. Это является сигналом для применения следующих предупредительных критериев;
- Один из результатов в серии вышел за пределы $+3\sigma$. Это может означать наличие случайной ошибки;
- Разница между двумя последовательными измерениями, выходящая за пределы $+4\sigma$, также может означать наличие случайной ошибки и требует проверки воспроизводимости измерения;
- Два последовательных измерения вышли за предел $+2\sigma$. Это может свидетельствовать о наличии систематической ошибки и необходимости проверки точности измерений;
- Если четыре последовательных измерения вышли за пределы $+1\sigma$, то это может быть связано с наличием систематической ошибки. Нужно проверить точность определения;
- Если десять последовательных измерений лежат по одну сторону от среднего значения измеряемой величины, то это является свидетельством систематической ошибки (дрейфа результатов) и требует проверки точности определения.

Существует несколько способов графической оценки полученных результатов, наиболее распространенные из которых получил метод контрольных карт Шухарта, метод кумулятивных сумм и метод построения карт по ежедневным средним. Последний метод, основанный на ежедневном расчете средних результатов какого-либо показателя в исследуемых образцах пациентов, интересен тем, что не требует использования контрольных материалов. Кроме того, он позволяет оценивать не только стадию анализа, но и выявлять ошибки преаналитического этапа, связанные с подготовкой пациентов, взятием и обработкой проб в данный день.

Действия при нарушении предупредительных и контрольных критериев.

При появлении результатов, подпадающих под один из предупредительных критериев, необходимо тщательно проанализировать весь ход аналитического процесса, работу измерительных приборов и расчет результатов, после чего их можно выдать врачу. Если нарушено несколько предупредительных или контрольных критериев, то это должно

служить основанием для остановки дальнейшего процесса проведения анализов и принятия мер для выявления и исключения ошибок.

Для предупреждения систематических и случайных ошибок необходимо:

- регулярно проводить техническое обслуживание используемого оборудования;
- регистрировать сбои в работе оборудования, а также меры по их устранению;
- своевременно закупать реагенты и контрольные материалы, с тем, чтобы иметь возможность сравнить их с материалами, приобретенными ранее и используемыми для работы в настоящий момент;
- создать необходимые условия для хранения реактивов, контрольных материалов и проб пациентов;
- обратить внимание на точность маркировки всех реагентов и исследуемых проб;
- регистрировать замену одной партии/вида реагентов (контрольных сывороток и др.) на другую;
- провести консультацию со специалистами фирмы-производителя наборов реагентов и/или коммерческих контрольных материалов.

Внешний контроль качества. Внешний контроль качества относится к системе объективной проверки результатов лабораторных исследований и проводится сторонней организацией для обеспечения сравнимости результатов, получаемых в разных лабораториях. С помощью хорошо организованной системы внешнего контроля качества можно описать уровень развития лабораторной медицины в стране или регионе и стимулировать ее развитие.

Существующая в России Федеральная система внешней оценки качества клинических исследований (ФСВОК) проводит несколько ежегодных циклов рассылки «слепого» контрольного материала, а также обеспечивает математическую обработку полученных данных и их рассылку лабораториям-участникам. Оценка количественных, полуколичественных и качественных исследований проводится по-разному и относится к разным разделам ФСВОК.

Следует отметить, что система внешнего контроля качества ни в коей мере не может заменить внутренний контроль, так как она не предназначена для ежедневной оценки результатов исследований, проводимых в лаборатории, или для выявления случайных ошибок и выбраковки конкретных неправильных результатов. Тем не менее, она помогает составить представление о состоянии дел во всех лабораториях, участвующих в данной программе, оценить рейтинг каждой лаборатории в списке других лабораторий-участниц, а также хорошо выявляет наличие систематических ошибок. Поэтому желательно, чтобы каждая лаборатория, помимо внутренних мероприятий по совершенствованию проводимых работ, принимала участие во внешних программах оценки качества (федеральных, международных).

Составители:

Генеральный директор ООО «Хема-Медика»,
кандидат медицинских наук
Ведущий научный сотрудник ООО «Хема-Медика»

Лебедин Ю.С.
Карпова Т.В.



ХЕМА

БИО-РЕАГЕНТЫ

- наборы реагентов для иммуноанализа (ИФА, иммуногистохимия, иммунохроматографические быстрые тесты);
- наборы реагентов для молекулярной диагностики (ПЦР);
- контрольные материалы для иммуноанализа;
- медицинские услуги для населения и мед. учреждений;
- научные исследования;
- производство и продажа изделий для медицины, ветеринарии, контроля пищевых продуктов, тонкой химической технологии;
- очищенные антитела, антигены, ферменты, гормоны и факторы роста;
- приборы и принадлежности для лабораторной диагностики; (анализы, УЗИ, врачебные консультации);

Разнообразные виды сотрудничества с учеными, врачами, ветеринарами.

Расширяем сеть региональных представителей.
Ждем Ваших отзывов и предложений по адресам:

info@xema.ru, www.xema.ru

- ООО «Хема-Медика» Москва, тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)
- ФООО «Хема-Медика» Санкт-Петербург, тел. (812) 271-24-41
- СП ООО «Хемма-Тест» Минск, Беларусь, тел.: (375 17) 284-29-85



Ассоциация специализированных производителей
тестов медицинской лабораторной диагностики



Система менеджмента качества
сертифицирована по ИСО 9001:2008