УДК 616
ББК 53.4

Клиническая лабораторная аналитика
Том I. Основы клинического лабораторного анализа
(Под редакцией В.В.Меньшикова)
М.: Агат-Мед, - 2002. - 860 с.

«Клиническая лабораторная аналитика» - многотомное руководство, содержащее как основополагающие сведения о современном клиническом лабораторном анализе (том I), так и детальные описания методов исследования в различных разделах лабораторной медицины (тома II - V).

В томе I представлены данные об основных составляющих работы в современной клинической лаборатории: об элементарных лабораторных процедурах (взвешивании, приготовлении растворов и их дозировании, калибровке), о видах лабораторных реагентов и правилах работы с ними, об основных аналитических технологиях и применяемом для их выполнения оборудовании, о современном техническом оснащении лабораторий, включая автоматические анализаторы и информационные системы, об управлении качеством исследований, о статистических методах обработки результатов анализов, о технике безопасности в клинической лаборатории. Том снабжен обширным справочным материалом: таблицами с характеристиками различных пробоподготовительных и аналитических устройств, текстами действующих нормативных документов. Материал книги богато иллюстрирован схемами, диаграммами, фотографиями приборов.

Издание рассчитано на работников клинико-диагностических лабораторий, на студентов и курсантов, изучающих лабораторную медицину.

Под общей редакцией проф.В.В.Меньшикова
Редакция: к.м.н. Д.Ю.Окунев
Верстка: А.В.Купец
© 2002 Агат-Мед

Подготовка к печати «Лабпресс».
Издатель - ООО «Агат-Мед». Лицензия ИД № 02365 от 17.06.2000 г.

Подписано в печать 15.07.02.
Формат бумаги 60x88 1/8. Бумага офсетная.
Печать офсетная. Печ. л. 54,0. Тираж 2000. Заказ № 2356.

Отпечатано с готовых диапозитивов в ГУП «Псковская областная типография». 180007, г. Псков, Рижский пр., 17.

ISBN 5-94419-006-X

Клиническая лабораторная аналитика в пяти томах

под общей редакцией

В.В. Меньшикова

Том I

Основы клинического лабораторного анализа

– Лексикон аналитики
– Элементы лабораторной работы
– Реагенты
– Основные аналитические технологии и оборудование
– Техническое оснащение лабораторий
– Управление качеством исследований
– Статистические методы
– Техника безопасности в лаборатории
– Нормативные документы по клинической лабораторной аналитике

Москва – Агат-Мед

2002

Содержание

Клиническая лабораторная аналитика и «технологическая революция» (вместо предисловия). *В.В.Меньшиков* 7

Лексикон клинической лабораторной аналитики. *Т.И.Лукичева, В.В.Меньшиков* 15

Единицы Международной системы единиц (СИ) в клинической лабораторной аналитике. *В.В.Меньшиков* 43

Элементы лабораторной работы. *И.С.Балаховский, Т.И.Лукичева, В.В.Меньшиков* 53

Лабораторные реагенты. *Н.Б.Самецкая* 109

Основные аналитические технологии и оборудование в современной клинической лаборатории. *И.С.Балаховский, Т.И.Лукичева, В.В.Меньшиков* 149

Современные методы ДНК- диагностики. *В.М.Говорун, К.Т.Момынгалиев* 365

Техническое оснащение клинических лабораторий : реализуемые принципы, сложившиеся тенденции, предвидимые перспективы. *И.С.Балаховский, Т.И.Лукичева, В.В.Меньшиков* 421

Управление качеством клинических лабораторных исследований : планирование, обеспечение, контроль. *В.В.Меньшиков* 623

Статистические методы в клинической лабораторной аналитике. *И.С.Балаховский* 791

Техника безопасности в клинико-диагностических лабораториях. *Н.Б.Самецкая* 839

Участники издания

Балаховский И.С. – доктор медицинских наук. *Автор разделов «Элементы лабораторной работы», «Основные аналитические технологии и оборудование в современной клинической лаборатории», «Техническое оснащение клинических лабораторий», «Статистические методы в клинической лабораторной аналитике».*

Говорун В.М. – доктор биологических наук. Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Минздрава РФ. Лаборатория генной инженерии и иммуногенетики, заведующий. *Автор раздела «Современные методы ДНК-диагностики».*

Лукичева Т.И. – кандидат медицинских наук. Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Научно-исследовательский центр, Лаборатория проблем клинико-лабораторной диагностики, ведущий научный сотрудник. *Автор разделов « Лексикон клинической лабораторной аналитики», «Элементы лабораторной работы», «Основные аналитические технологии и оборудование в современной клинической лаборатории», «Техническое оснащение клинических лабораторий».*

Меньшиков В.В. – доктор медицинских наук. Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Научно-исследовательский центр, Лаборатория проблем клинико-лабораторной диагностики, заведующий. *Общая редакция и предисловие. Автор разделов « Лексикон клинической лабораторной аналитики», «Элементы лабораторной работы», «Основные аналитические технологии и оборудование в современной клинической лаборатории», «Техническое оснащение клинических лабораторий», «Управление качеством клинических лабораторных исследований».*

Момыналиев К.Т. – кандидат биологических наук. Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Минздрава РФ, Лаборатория генной инженерии и иммуногенетики, старший научный сотрудник. *Автор раздела «Современные методы ДНК-диагностики».*

Самецкая Н.Б. – кандидат биологических наук. Московская медицинская академия им.И.М.Сеченова, Научно-исследовательский центр, Лаборатория проблем клинико-лабораторной диагностики, ведущий научный сотрудник. *Автор разделов «Лабораторные реагенты», «Техника безопасности в клинической лаборатории»*

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ АНАЛИТИКА И "ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕВОЛЮЦИЯ"

(вместо предисловия)

В. В. Меньшиков

Все три составляющие любой лабораторной дисциплины - клиническая патобиология, клиническая лабораторная аналитика и клиническая лабораторная диагностика - испытывают в своем развитии и совершенствовании высокую степень зависимости об общего научно- технического прогресса. Особенно ярко проявляется эта взаимосвязь в отношении лабораторной аналитики, что затем оказывает сильное влияние на всю сферу лабораторной медицины. Это определяется тем бесспорным фактом, что важнейшим инструментом лабораторной медицины служат аналитические методы, позволяющие в сложных биологических системах, какими являются биологические жидкости и другие материалы организма человека, обнаруживать и характеризовать отдельные их компоненты, представляющие интерес для исследователя. В свою очередь клиническая медицина все более широко использует аналитические возможности лабораторной медицины для целей диагностики болезней и слежения за их течением, включая оценку эффекта лечения.

Научно-технический прогресс во второй половине столетия привел к бурному развитию технологий в различных сферах деятельности человечества. Темпы появления новых технологий обнаруживают экспоненциальную зависимость от фактора времени, что позволяет говорить о многосторонней "технологической революции". Оценка темпов развития методических возможностей лабораторной медицины применительно к широкому кругу компонентов биожидкостей - клеточных элементов крови и других биожидкостей, химических компонентов эндогенного и экзогенного происхождения, иммунных тел, бактерий, вирусов, грибов, паразитарных организмов - позволяет утверждать, что "технологическая революция" происходит и в клинической лабораторной аналитике, тем более, что клиническая лаборатория становится точкой приложения многих технологических новшеств (табл. 1).

Таблица I

Конвергенция технологий

Компьютеризация

Встроенные микропроцессоры
Лабораторные информационные системы
Больничные информационные системы
Экспертные системы
CD-ROM в обучении

Распознавание образов
Управление аналитическим процессом
Управление информационными потоками
Обработка результатов исследований
Интерпретация результатов
«Виртуальная» лаборатория

Средства анализа → КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ← ***Средства связи***

Автоматизация
Автоматические анализаторы
Роботизация
«Front-end automation»
Комплексная автоматизация
Миниатюризация
Тест-полоски
Кассетные тесты
Биосенсорные анализаторы
Микро- и наночипы

Телефон: проводной, сотовый
Стекловолоконные сети
Интернет
Телемедицина: аудио- и видеоконференции, консультации, экспертиза

Методы анализа

Лигандные методы
Моноклональные антитела
Аптамеры
Молекулярно- биологические методы
Неинвазивные методы

Средства транспорта

Изотермические контейнеры
Авиапочта
Экспресс-почта

Направления технологического прогресса в клинической лаборатории многообразны.

Определяющим фактором, по-видимому, следует признать значительное расширение арсенала самих исследовательских принципов и основанных на них методов анализа биоматериалов. Можно указать в качестве наиболее ярких примеров на открытие принципа лиганда (связывание специфического белка с той или иной меткой) в 70-е годы и на открытие принципа полимеразной цепной реакции в 80-е годы. В настоящее время уже трудно представить себе и клиническую биохимию, и иммунологию, и лекарственный мониторинг, и исследования гормонов без различных вариантов лигандных методов. С применением моноклональных антител эти методы приобрели беспрецедентную специфичность, а использование для количественного определения флуоресцентных и люминесцентных меток позволило существенно повысить их чувствительность.

Полимеразная цепная реакция открыла эру молекулярно-биологических методов в клинической лабораторной аналитике. Вслед за ней появился ряд других вариантов исследования нуклеиновых кислот, поставивших на новую основу диагностику ряда инфекционных болезней, в том числе вирусной природы, генетических расстройств, опухолевых поражений.

Произошел решительный поворот в направлении использования готовых аналитических форм, т. е. комбинаций жидких, сухих, закрепленных на различных носителях химических и биологических реагентов. В некоторых видах готовых аналитических форм предусматривается не только сочетание всех необходимых для анализа реагентов в определяемых методикой количественных соотношениях, но и такое их пространственное размещение в материальном континууме (кассете, полоске, многослойном аналитическом элементе и т. п.), которое определяет сам ход аналитического процесса. На этой основе получили развитие разновидности компактных аналитических форм, позволяющие производить быструю детекцию искомых аналитов без применения анализаторов или с помощью приборов "карманного" размера. Понятно, что использование таких готовых аналитических форм существенно влияет и на организацию труда в лаборатории, и на способы применения исследований биоматериалов пациентов в лечебно-диагностическом процессе.

Другим направлением технологического прогресса в клинической лаборатории стало создание средств автоматизации лабораторного ана-

лиза в различных субдисциплинах лабораторной медицины. Ныне автоматическое выполнение лабораторных анализов возможно применительно не только к химическим компонентам биожидкостей, но и к ферментам, факторам тромбогенеза, иммунным телам, клеткам крови, корпускулярным элементам осадка мочи, микроорганизмам, нуклеиновым кислотам. Автоматизация коснулась и стадии подготовки проб биоматериала, что позволяет реально осуществлять комплексную автоматизацию клинической лаборатории и создавать автоматизированные лаборатории. Внедрение в различные звенья лабораторного обследования пациентов вычислительной техники, создание лабораторных информационных систем позволяет решать многообразные задачи управления лабораторным аналитическим процессом, обработки, архивирования и передачи лабораторной информации более надежно и эффективно. Совершенствование технологий систем связи позволяет применить их и для включения лабораторных данных в оборот телемедицины, что может быть использовано для оказания консультативной помощи высококвалифицированных специалистов их коллегам из лабораторий лечебных учреждений в "глубинке", для проведения телеконсилиумов по сложным для интерпретации результатам лабораторных исследований и т. д.

В двери клинических лабораторий все более уверенно стучится новая плеяда микроминиатюрных лабораторных устройств, производимых с использованием достижений микролектронной промышленности - "микрочипных" анализаторов или "микрототальных аналитических систем". Вполне возможно, что на основе этих устройств лабораторная сфера клинической диагностики и сами лаборатории приобретут совершенно иной вид и иные, неизмеримо большие, чем сейчас, возможности.

Хотя реализация в полной мере всех этих сторон технологического совершенствования значительной части российских лабораторий не под силу в настоящее время из-за известных экономических трудностей, тем не менее быть осведомленными о современных возможностях в различных разделах лабораторной медицины нашим специалистам необходимо, чтобы при изменении условий в лучшую сторону быть готовыми к рациональному обновлению и совершенствованию технического и технологического оснащения лаборатории и воспользоваться преимуществами технологических нововведений.

Пышный расцвет возможностей лабораторной аналитики, дав несомненный импульс совершенствованию лабораторной диагностики, при-

вел к возникновению некоторых трудностей в практике работы клинических лабораторий. Обилие методических вариантов, заложенных в готовых аналитических формах, предлагаемых различными производителями, породило разнобой в результатах количественного определения одних и тех же аналитов при использовании неоднородных наборов реагентов. Наличие разнообразных модификаций лабораторной аппаратуры приводит к затруднениям при выборе оборудования.

В качестве выхода из этой ситуации в 70-80 -е годы в нашей стране был предложен и реализован применительно к довольно широкому кругу лабораторных тестов принцип унификации методов, то-есть их отбора на основе научных, технических, экономических критериев, и настойчивой их рекомендации для повсеместного применения, что в определенной мере облегчалось централизованной системой снабжения реактивами. Изданный в 1987 г. справочник " Лабораторные методы исследования в клинике" был основан по большей части на описаниях унифицированных методов исследования, утвержденных приказами Министерства здравоохранения. *Хотя принципы определения аналитов*, заложенные в этих методах и по сию пору используются многими фирмами - производителями готовых наборов реактивов, тем не менее в условиях рыночного хозяйства и финансовой самостоятельности учреждений здравоохранения унификация методов реально приобрела лишь рекомендательный характер. В то же время нельзя игнорировать и диктуемую клиническим предназначением результатов лабораторной работы необходимость обеспечивать определенную степень надежности проводимых в лаборатории анализов. Это выдвигает идею стандартизации требуемой степени точности результатов исследований, исходя из параметров биологически обусловленной вариабельности компонентов биоматериалов или из уровня точности, достигнутого в лучших лабораториях, что уже реализуется в лабораторных службах США и Европы. При этом в качестве ориентира должны использоваться референтные, то- есть, особо точные методы исследования; должна решаться проблема доступности для лабораторий калибраторов, имеющих необходимую степень "прослеживаемости" их свойств от сертифицированных референтных материалов; должны предъявляться основанные на установленных нормах точности результатов лабораторных исследований требования к свойствам приобретаемой учреждениями здравоохранения аналитической аппаратуры и реагентов.

* * *

Расширение диапазона применяемых в лаборатории аналитических технологий настоятельно требует не только углубления базового образования лабораторных специалистов, но и систематического обогащения их новыми знаниями по мере прогресса лабораторной медицины. Предлагаемый ныне вниманию работников клинико-диагностических лабораторий труд "Клиническая лабораторная аналитика" имеет целью снабдить читателей современной информацией об аналитических процедурах, позволяющих наиболее надежно осуществить обнаружение и/или определение (измерение) в биожидкостях широкого круга компонентов (аналитов), представляющих интерес для клинической медицины. Спектр этих интересов, в свою очередь, расширяется при появлении сведений о новых возможностях лабораторной медицины.

Обычно структура книг такого рода ориентирована на отдельные стороны обмена веществ, на отдельные органы или системы и т. п. Этот принцип, по нашему мнению, более отвечает руководствам по клинической лабораторной диагностике. Данный же труд ориентирован на аналитический процесс.

Первый том издания посвящен основным понятиям, элементам лабораторной работы, основным аналитическим технологиям и оборудованию и другим сведениям об основах клинического лабораторного анализа. В определенной последовательности представлена вся гамма современных подходов к решению аналитических задач, возникающих в процессе лабораторной диагностики. Логика этой последовательности: от элементов лабораторной работы - к принципам тонких аналитических технологий; от пипетки - к сложным автоматизированным анализаторам, от клавишного счетчика - к компьютеру. Кому-то могут показаться излишними чрезмерно элементарные вещи, другому может казаться преждевременным пока еще недоступное многим последнее слово техники. Между тем, в лабораторном деле нельзя игнорировать ни азы аналитики, ни ее современные высоты и глубины. Материальный мир современной клинической лаборатории (а тем более при существующем многообразии форм и размеров лабораторий в отечественных учреждениях здравоохранения и их реальном экономическом базисе) вмещает как простые, традиционные, так и архисложные средства анализа - лишь бы они давали надежные, заслуживающие доверия результаты исследований. Выбор из этого разнообразия средств и методов определяется, в

конечном счете, балансом клинических потребностей и экономических возможностей каждого учреждения. Но для принятия оптимального решения необходима правильная ориентация. Некоторые основания для такой ориентации читатели почерпнут из содержания первого тома. Кроме того, материалы этого тома, являясь введением в клиническую лабораторную аналитику, могут служить и дидактическим целям при базовой подготовке лабораторных специалистов, и основой для освоения материала последующих томов.

В последующих томах издания в центре внимания - аналит, в каком бы биологическом материале он ни находился и каким бы методом он ни исследовался. Поэтому большая часть издания - "Частная лабораторная аналитика" - содержит разделы, посвященные группам аналитов, изучаемых отдельными лабораторными субдисциплинами, использующими специфические методы исследования. В распоряжение лабораторных работников предоставляются необходимые теоретические и практические сведения по аналитическим процедурам во всех разделах, составляющих современную лабораторную медицину. Представлены как наиболее часто используемые процедуры, так и их варианты, сведения об их чувствительности, специфичности, правильности и воспроизводимости. (Следует, однако, заметить, что эти сведения в ряде случаев не могут приниматься за абсолютную истину, поскольку они зависят от конкретных условий воспроизведения методов : применяемых реагентов, измерительных приборов и т. д.) Эта часть издания задумана как практическое пособие для повседневной работы клинико-диагностических лабораторий во всем диапазоне современных возможностей лабораторной медицины.

Предлагаемое вниманию лабораторных специалистов многотомное руководство имеет определенную преемственность по отношению к изданному в 1987 г. под той же редакцией справочнику " Лабораторные исследования в клинике", который сыграл на определенном этапе свою роль в методическом оснащении отечественных лабораторий

Нельзя не отдать должное составителям и авторам того издания - незабвенной и самоотверженной Л. Н. Делекторской, высококомпетентной Р. П. Золотницкой, внесшей немалый вклад в лабораторную квалиметрию Е. Н. Гараниной, всем другим специалистам,творчески и плодотворно сотрудничавшим в работе над справочником, который был издан тиражом свыше 140 тысяч экземпляров и стал настольной кни-

гой в большинстве лабораторий нашей страны. Продолжая то, что было представлено в нашей литературе справочником "Лабораторные исследования в клинике", частично воспроизводя его содержание в той мере и в тех разделах, насколько и где прежние сведения сохранили свое значение, настоящий труд не является вторым изданием прежнего справочника. Диапазон информации в данном издании существенно шире, чем в справочнике десятилетней давности, и рамки, и материал новой книги иные, поскольку целью было представить современные аналитические возможности клинических лабораторий, значительно изменившиеся за минувшее десятилетие.

Эта книга создается на рубеже XX и XXI столетий и она опирается на достигнутое в лабораторной сфере в прошлом. Вместе с тем, контуры новой реальности клинических лабораторий уже проступают не только в докладах и статьях, но и в технических разработках и методических новациях. Пока мы еще с робостью заглядываем в это будущее, понимая, что от смелой идеи до рутинной практики - немалая дистанция. Однако, нельзя не осознавать, что и промедление с воплощением в жизнь новых эффективных аналитических возможностей наносит ущерб главному предназначению клинической лаборатории - своевременно снабжать клинику наиболее информативными и достоверными сведениями о состоянии пациента для достижения наивысшего лечебного эффекта. Чтя традиции и опираясь на опыт, следует в то же время держать открытыми двери наших лабораторий для того нового, что несет с собой научно-технический прогресс.

Редактор и авторы надеются, что их труд, отражая достижения и тенденции "технологической революции" в клинической лабораторной аналитике, будет серьезным подспорьем в достижении уровня "хорошей лабораторной работы в" каждой российской клинической лаборатории.

ЛЕКСИКОН КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ АНАЛИТИКИ

В литературе при описании деятельности клинической лаборатории можно встретить ряд терминов, рассматриваемых как синонимы: "анализ", "исследование", "определение", "измерение", "тест" и т. п. Встречаются также разночтения в отношении и иных понятий, важных для описания факторов, критериев, действий и пр., имеющих существенное значение для лабораторной аналитики. Возникают трудности при чтении и переводе зарубежной литературы. Для упорядочения терминологии авторы стремились использовать стандартные определения основных понятий, что должно способствовать упорядочению изложения материала, относящегося к различным разделам лабораторной медицины, и облегчать правильное восприятие читателем содержания книги.

Возможно, некоторые из этих дефиниций покажутся вполне очевидными и хорошо известными, однако, представляется целесообразным выстроить всю систему понятий, чтобы не оставить места для каких-либо неясностей. Некоторые из определений, основанные на общенаучных представлениях и терминологии, специфицированы применительно к сфере клинической лабораторной аналитики.

* * *

Авидность - описывает стабильность комплекса антиген-антитело. Характеризует совокупность всех сил во всех местах связывания на антигене и обычно превышает простую сумму этих сил.

Аликвотная часть - определенная часть общего количества материала, которая имеет такие же свойства, что и весь материал.

Анализ - процесс изучения того или иного объекта с целью получения информации о его составе, структуре, свойствах, качественных или количественных характеристиках.

Анализ лабораторный - процесс применения аналитической процедуры для обнаружения/определения в пробе биологического материала искомого компонента. Основная профессиональная деятельность работника клинико-диагностической лаборатории.

Анализатор - техническое устройство, в котором совмещены приспособления для выполнения различных этапов аналитической процедуры: дозирования пробы биоматериала и реагентов, смешивания, термостатирования, измерения, расчета результатов и т. д. Анализаторы могут быть представлены в различных конфигурациях: полуавтоматической, автоматической. Большинство современных анализаторов оснащены компьютерами, позволяющими программировать осуществление многих вариантов аналитических процедур, управлять функционированием самого анализатора, осуществлять контроль качества исследований, проводить сопоставление результатов с референтными пределами, накапливать банк данных.

Аналит - компонент биоматериала, обнаружение/определение которого является целью аналитической процедуры. Должен быть охарактеризован, в зависимости от его специфики, в терминах биологии, химии (строение, физические химические, биологические свойства, роль в физиологических процессах или в их нарушении и т. д.).

Аналитика клиническая лабораторная - совокупность знаний и умений в области лабораторного анализа биологических материалов человека в целях обнаружения/определения в них химических или биологических компонентов, представляющих интерес для клинической медицины в отношении диагностики болезней и слежения за их течением, эффектом лечебных мер и т. п. Составная часть лабораторной медицины в целом и каждой ее субдисциплины.

Аналитическая процедура - определенная строго специфицированная по ряду существенных параметров (время, объем, температура, длина волны света и т. п.) последовательность (совокупность) приемов обработки пробы биоматериала для обнаружения/определения отдельного компонента или их группы.

Аналитический прибор - техническое устройство, позволяющее на основе тех или иных физических принципов осуществлять анализ биоматериала для обнаружения/определения искомого аналита.

Аналитический сигнал - регистрируемая визуально или на приборе величина физического свойства анализируемого объекта, функционально связанная с определяемым содержанием.

Антиген - материал, способный реагировать с антителом, образуя комплекс антиген-антитело.

Антитело - белок класса иммуноглобулинов, который вырабатывается специальным классом лимфоцитов в ответ на его стимуляцию чужеродным материалом.

Аффинность - описывает силу связывания одиночного участка (site) связывания на антигене с соответствующим ему антителом.

Аудит качества - систематическое и независимое изучение системы контроля качества исследований в лаборатории.

Биноминальное (Пуассона) распределение - распределение результатов определений в вариационном ряду, где вероятности появления отдельных случайных значений выражаются коэффициентами разложения бинома Ньютона.

Биолюминесценция - вид люминесценции, присущий живым организмам. Фотоны испускаются в результате биологически опосредованных реакций, которые характеризуются образованием очень высокого кванта световой энергии.

Биосенсор - аналитическое устройство, в котором роль чувствительного (распознающего) элемента выполняет компонент биологической природы каталитического (микроорганизм, клетки тканей растений или животных, ферменты) или аффинного (антитела, рецепторы, нуклеиновые кислоты) характера. тесно связанный с трандьюсером, т. е. электрохимическим или электромагнитным преобразователем изменений биологического компонента (образование электроактивного соединения, изменение pH. изменение массы, выделение тепла, излучение и др.) в сигнал для электрода, термистора, счетчика фотонов, пьезоэлектрического устройства и др., которые затем обрабатываются с помощью электронной системы в цифровой электронный сигнал, пропорциональный содержанию аналита. Сочетает избирательность биологической системы с оперативными возможностями современной электроники.

БРИСТ - см. Радиоаллергосорбентный метод.

Вариация аналитическая - колебания значений аналита, обусловленные аналитическими факторами, включая погрешности случайные и систематические, связанные с погрешностями приборов, реагентов, калибраторов, ошибками операторов и т. п.

Вариация биологическая - колебания значений аналита, обусловленные биологическими факторами, включая факторы внутрииндивидуальные (биологические ритмы сезонного, месячного, суточного характера, наслед-

венность, в т. ч. тип сложения) и межиндивидуальные, популяционные (пол, возраст, этнос, привычная среда обитания, включая климат, образ жизни, профессию). Соотношение влияния этих групп факторов выражается формулой $S^2_{биол} = S^2_{межинд} + S^2_{внутриинд}$. Пределы биологической вариации для каждого аналита зависят от его физиологической роли в организме.

Вариация патологическая - колебания значений аналита, обусловленные влиянием факторов патологии : наличием патогенного агента, реакцией физиологических систем, в т. ч. систем защиты организма, дефектами той или иной физиологической системы или органа и т. п. Обнаружение и верификация патологической вариации и ее причин составляет сущность лабораторной диагностики.

Вариация преданалитическая - колебания значений аналита, обусловленные условиями взятия образца биоматериала, его хранения и транспортировки до проведения анализа.

Вариация ятрогенная - колебания значений аналита, обусловленные интерференцией диагностических и лечебных мер и средств, предпринимаемых в отношении пациента в период, предшествующий проведению лабораторного теста и взятию биоматериала.

Величина должная - методически зависимая, статистически достоверная, наиболее вероятная величина результатов повторных определений одних и тех же компонентов в одном и том же материале.

Величина (измеряемая) - свойство явления, тела, вещества, которое может отличаться качественно и определяться количественно.

Величина истинная - объективно существующая числовая величина результатов анализа, которую можно определить только приблизительно как наиболее вероятную величину. В биологическом материале, с которым имеют дело клинические лаборатории, невозможно установить истинную величину. Для многих веществ определяемая(измеряемая) величина зависит от используемого метода. Некоторые вещества существуют в различных формах, которые могут быть связаны с другими веществами или свободны от них; связывание может быть разрушено одними методами анализа и сохраниться при других. Поскольку мы никогда не знаем абсолютных величин, принимается, что средняя величина результатов из нескольких референтных (экспертных) лабораторий, использующих один и тот же метод, является истинной величиной, если новая информация не отвергает эту гипотезу.

Величина наиболее вероятная - статистически достоверная величина, которая получена аналитическим методом, дающим результаты, максимально приближающиеся к истинной величине.

Величина ожидаемая - числовая величина результата анализа, которая ожидается на основании имеющихся результатов анализа других данных обследования и симптомов, находящихся в определенной взаимосвязи с наблюдаемой величиной.

Величина указанная (установленная) - должная величина, указанная изготовителем для соответствующих компонентов контрольного или калибровочного материала.

Величина холостой пробы (смеси) - результат измерения холостой пробы (смеси).

Внешняя оценка качества - контроль сравнимости результатов, полученных в нескольких лабораториях на одном и том же контрольном материале одними и теми же методами или методами, дающими статистически достоверно совпадающие результаты.

Воспроизводимость аналитического метода - характеризуется воспроизводимостью результатов, полученных этим методом.

Воспроизводимость измерений - качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполняемых в различных условиях (в различное время, в различных местах, различными методами). Различают воспроизводимость в серии, во времени (день ото дня) и межлабораторную воспроизводимость. Не имеет числовой величины, определяется разбросом результатов.

Газометрический метод - метод, основанный на определении объема газа, образовавшегося в результате химической реакции.

Гаптен - небольшая органическая молекула, которая представляет собой одиночный антигенный детерминант. Обычно не способен самостоятельно генерировать иммунную реакцию.

Гель-фильтрация (гель-хроматография, ситовая хроматография, гельпроникающая хроматография) - метод разделения смеси веществ с разной молекулярной массой путем фильтрации ее через различные поперечно-ячеистые гели (декстраны, биогели, липофильные гели и др.). Прохождение веществ через колонку с гелем определяется размерами пор между гранулами геля. Вещества, молекулы которых значительно меньше, чем размеры пор, свободно диффундируют внутрь гранул. Поэтому более крупные молекулы перемещаются по колонке с большей скоростью, чем мелкие. Компоненты исследуемой смеси элюируются из колонки в порядке уменьшения молекулярной массы. Вещества в элюате могут быть определены различными методами (спектрофотометрическим, флоорометрическим, колориметрическим и др.).

Гемагглютинация - феномен склеивания эритроцитов. Она может быть прямой за счет непосредственного воздействия агентов на эритроциты и непрямой, когда обработанные антигеном (антителами) эритроциты агглютинируются иммунной сывороткой (антигеном).

Гемадсорбция - способность клеток, инфицированных некоторыми гемагглютинирующими вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты.

Гетерогенное исследование - исследование, при котором перед измерением аналита необходимо разделять связанные и свободные его составляющие.

Гомогенное исследование - исследование, при котором измерение аналита осуществляется в присутствии как свободных, так и связанных его составляющих.

Гравиметрический метод - весовой анализ, основанный на точном измерении массы вещества. После взятия точной навески анализируемой пробы, перевода ее в раствор и получения малорастворимого осадка соединения, содержащего определяемое вещество, осадок отделяют от раствора фильтрованием, промывают, сушат или прокаливают до постоянной массы. Зная навеску анализируемой пробы, массу осадка и его состав, вычисляют содержание определяемого вещества.

Градуировочная характеристика - зависимость между значениями величин на входе и выходе средства измерения, составленная в виде таблицы, графика или формулы.

Диапазон измерений - область значений измеряемой величины, для которой нормированы допускаемые погрешности средства измерений.

Денситометрия - вид фотометрического анализа, основанный на измерении оптической плотности светопоглощающих сред при прохождении через них или отражении от них света определенной части спектра (в последнем случае называется отражательной денситометрией или отражательной фотометрией).

Диагностические таблетки, полоски - таблетки реактива, полоски фильтровальной бумаги, пропитанные смесью реактивов, пластмассовые полоски, к одной из сторон которых прикреплены квадраты фильтровальной бумаги, пропитанные смесью реактивов. Исследуемую жидкость наносят на таблетку или индикаторную зону полоски (либо полоску погружают в исследуемую жидкость) и по времени появления окраски или по ее интенсивности судят о наличии (отсутствии) исследуемого вещества (качественный метод). Сравне-

ние интенсивности окраски индикаторной зоны с цветными шкалами (стандартами) позволяет дать приблизительную количественную оценку содержания вещества (полуколичественный метод). Количественное определение осуществляют путем измерения окраски индикаторной зоны полоски на рефлектометре (отражательном фотометре). Монотесты - диагностические полоски, рассчитанные на один вид исследования, имеют одну индикаторную зону. Политесты - комбинированные полоски, имеющие несколько индикаторных зон для соответствующих видов исследований.

Допустимые пределы аналитической вариации - рассчитанные на основе воспроизводимости изо дня в день пределы вариации значений аналита, обусловленной факторами аналитической процедуры (прибор, метод, человеческий фактор и т. д.), не влияющие на принятие клинических решений, адекватных состоянию пациента.

Измерение - совокупность экспериментальных операций, имеющих целью определение значения величины.

Изотопное разведение (изотопное разбавление) - метод определения малых (следовых) количеств вещества на основе введения их радиоактивных изотопов в кровь, реактив и пр. По разности введенной и поглощенной радиоактивности рассчитывают искомую концентрацию определяемого вещества. Чаще всего используется метод двойного (двукратного) и многократного разведения.

Изоэлектрическое фокусирование - метод фронтального электрофореза в градиенте pH. Разделение амфотерных веществ (аминокислот, пептидов) осуществляют в вертикальной колонке из амфолитов или полиакриламидного геля, каждое вещество движется в электрическом поле к той части колонки, где значение pH соответствует его изоэлектрической точке, и там останавливается (фокусируется).

Иммунодиффузия - один из методов иммунологического анализа антигенов и антител, основанный на реакции преципитации. В результате реакции между антигенами и антителами, поступающими в гель путем диффузии, в зоне оптимального их соотношения образуются полосы преципитации, легко выявляемые визуально или окрашиванием на белки. Особенностью метода является то, что каждая пара антиген-антитело формирует свою полоску, и реакция не зависит от наличия в системе других антигенов и антител. Местоположение полос преципитации определяется скоростью диффузии антигенов и антител и их концентрацией в исходных растворах.

Иммуноген - всякое вещество, которое способно стимулировать лимфоциты к выработке антител.

Иммунопреципитация автоматизированная - метод, основанный на классической преципитации между антигеном и соответствующим антителом. В результате преципитации происходит помутнение раствора, интенсивность светорассеяния или флюоресценции которого под действием света определенной длины волны пропорциональна концентрации определяемого антигена. Все этапы реакции автоматизированы и выполняются на автоматических анализаторах поточного принципа действия.

Иммуноферментный анализ - вид иммунохимического анализа, основанный на иммунологической реакции антигена с соответствующим антителом с образованием комплекса антиген-антитело, для выявления которого в качестве метки (маркера) антигена, антитела или обоих компонентов этой реакции используют их конъюгаты с ферментами. ИФА, в котором необходимо разделение свободных и связанных с ферментом молекул, называется гетерогенным (см. "Ферментсвязывающий иммуносорбентный анализ"). В гомогенном ИФА поведение конъюгатов, меченых ферментом, целиком определяется реакцией антиген-антитело, и разделение свободных и связанных меченых молекул не требуется. Гомогенный ИФА - EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique)- используется главным образом для определения гаптенов. Определенный гаптен ковалентно связывается с молекулой фермента вблизи активного центра. При специфическом связывании образовавшегося комплекса с антителами против гаптена происходит ингибирование каталитической активности фермента. В другом случае ингибированный в конъюгате с гаптеном фермент вновь активируется при связывании конъюгата со специфическими к гаптену антителами. Количественные измерения веществ в ИФА основаны на определении активности ферментов (после добавления в иммунохимическую систему специфических для данных ферментов субстратов) колориметрическими методами или путем измерения теплового эффекта ферментативной реакции.

Иммунофлюоресцентный метод - иммунохимический метод, основанный на использовании явления люминесценции (флюоресценции) для исследования реакции антиген-антитело, происходящей на поверхности клеток или в срезах тканей. Локализацию изучаемого антигена (антитела) устанавливают специфическими антителами (антигенами), мечеными флюоресцирующими красителями - флюорохромами (например, флю-

оресцеин, роданин). Флюоресценцию образующегося комплекса измеряют или наблюдают при микроскопии в ультрафиолетовом свете. В прямых иммунофлюоресцентных методах на препарат, содержащий антигены, наносят флюоресцирующую специфическую антисыворотку (антитела). В непрямых методах определяемый антиген обрабатывают немеченой антисывороткой. Несвязавшиеся белки отмывают, наносят флюоресцирующую антисыворотку против глобулина немеченой сыворотки. Непрямые методы более чувствительны и позволяют использовать ограниченный набор флюоресцирующих антител.

Иммунохимические методы - совокупность методов определения химического строения и свойств антигенов и антител, а также химических закономерностей их взаимодействия. Принципы иммунохимических методов основаны на специфичности иммунологических реакций и белковой природе антител.

Иммуноэлектрофорез противоточный (встречный) - электрофоретический метод, в котором антитела под действие эндоосмоса перемещаются в геле в направлении к катоду, противоположном направлению перемещения в электрическом поле антигенов, обладающих электрофоретической подвижностью. Имея более низкую изоэлектрическую точку, антигены при электрофорезе перемещаются к аноду быстрее, чем антитела к катоду. В области реакции антигенов с соответствующими антителами образуются полосы преципитации (расположение перпендикулярно к направлению электрического тока), по которым выявляются исследуемые вещества.

Иммуноэлектрофорез прерывистый встречный - разновидность иммуноэлектрофореза, характеризующаяся уменьшением ионной силы буфера в геле по сравнению с таковой буфера, заполняющего электродные камеры, а также сокращением (прерыванием) времени электрофореза до 1-1, 5 ч.

Иммуноэлектрофорез "ракетный" (электроиммунодиффузия, метод Laurell) - иммунохимический метод, при котором сочетаются электрофорез и имунодиффузия. Дает возможность различить сходные по электрофоретической подвижности вещества с помощью специфической реакции преципитации между антигеном. нанесенным на пластинку с гелем (агар, агароза) или на ацетат целлюлозы, и соответствующими антителами, содержащимися в них. Длина ракетоподобных иммунопреципитатов пропорциональна концентрации антигена.

Интерференция - мешающее влияние неанализируемых компонентов на результаты измерения анализируемых компонентов.

Ионоселективные электроды - электрохимические преобразователи, в которых возникает электрический потенциал, зависящий от активности ионов в данной среде, по отношению к которым избирателен (селективен) данный электрод. Предназначены для определения активности ионов потенциометрическим или вольтамперометрическим методами, основанными на измерении электродвижущей силы электрохимической цепи, образованной ионоселективным и вспомогательным электродами, погруженными в анализируемую среду. Известны электроды, селективные к ионам H^+, K^+, Ca^{++}, Na^+ и галогенидам. Принцип действия газоселективных электродов основан на потенциометрическом или вольтамперметрическом измерении продуктов взаимодействия анализируемого газа с индикаторным раствором. Субстрат-селективные электроды предназнчены для определения веществ, являющихся субстратами ферментативных реакций. Принцип их действия основан на ферментативном расщеплении субстрата и последующем определении при помощи ионоселективного электрода одного из продуктов реакции.

Калибровочная зависимость - математическая формула, связывающая определяемую концентрацию (или абсолютное содержание) анализируемого компонента с аналитическим сигналом.

Калибровочная кривая - графическое представление количественной связи между измеряемыми и анализируемыми величинами, при этом отдельные калибровочные точки соединены друг с другом калибровочной линией.

Калибровочная проба (смесь) - проба (смесь) для анализа, которая состоит из калибровочного раствора и реактивов.

Калибровочный раствор - раствор, который соответствует эталонному раствору и применяется для построения и оценки калибровочной кривой.

Калибровочная точка - графическое представление двух взаимосвязанных значений анализируемой и измеряемой величин.

Калибровочный фактор - среднее значение для калибровочных точек линейной калибровочной кривой, представляющее частное от деления взаимосвязанных значений анализируемой и измеряемой величин. Служит для расчета результатов анализа.

Квалиметрия - отрасль знаний, изучающая способы и приемы количественной оценки качества результатов деятельности, связанной с измерением.

Квалиметрия лабораторная - совокупность знаний и умений количественной оценки результатов лабораторных исследований.

Колориметрия - совокупность методов количественного химического анализа, основанных на зависимости интенсивности окраски раствора от концентрации в нем окрашенных веществ. Измерение поглощения или пропускания определенной видимой части светового спектра окрашенными растворами производится на фотоэлектрических колориметрах или спектрофотометрах.

Компонент анализируемый (аналит) - компонент биологического материала, который подвергается анализу с целью его обнаружения или определения.

Конкурентное белковое связывание (сатурационный анализ) - метод, основанный на конкуренции анализируемого вещества и его меченого (радиоактивным изотопом, конъюгатом с ферментом и др.) аналога за места связывания в специфических связывающих эти вещества белках.

Контроль качества внутренний (внутрилабораторный) - система мер, предназначенных для оценки (главным образом с помощью исследования контрольного материала) качества результатов анализа, полученных в лаборатории.

Контроль качества проведения аналитических методов - внутренний контроль и внешняя оценка качества исследований, проведенных оцениваемыми методами.

Контрольный материал - однородный материал, результаты исследования которого используются для оценки погрешности выполняемого аналитического измерения (исследования), т. е. для осуществления контроля качества лабораторных исследований, и насколько это возможно приближающийся по наиболее существенным свойствам к исследуемому и анализируемому материалу.

Контроль ожидаемого совпадения - оценка результатов анализа относительно возможности или вероятности появления соответствующих им симптомов у пациента. Для этого оценке подвергаются результаты анализа и другие данные обследования и симптомы, которые могут находиться в определенной взаимосвязи с наблюдаемым результатом анализа.

Контрольный опыт - предназначен для выявления факторов, которые могут оказывать отрицательное влияние на определение анализируемого компонента. Он включает проведение опыта и информацию об ожидаемых результатах.

Контрольная проба - аликвотная часть контрольного материала, предварительно обработанного таким же образом, как при приготовлении анализируемого раствора; используется непосредственно для анализа.

Лаборатория - учреждение или подразделение учреждения, предназначенное и оснащенное кадрами и специальным оборудованием для проведения исследований, анализов.

Лаборатория клиническая - подразделение медицинского учреждения, предназначенное и оснащенное для проведения клинических лабораторных исследований.

Масс-спектрометрия - метод исследования веществ, основанный на определении массы и количества ионов этого вещества. Исследуемое вещество в газообразном состоянии подвергается ионизации в вакууме. Образовавшиеся ионы в зависимости от величины отношения их массы к заряду разделяются с помощью электрических и магнитных полей в масс-спектрометре. Метод позволяет определять качественный и количественный состав веществ, их молекулярную структуру на основе измерения относительного содержания нераспавшихся и распавшихся после ионизации молекул.

Материал анализируемый - исследуемый материал, приготовленный путем разделения, фракционирования и подвергаемый анализу.

Материал исследуемый - первичный биологический материал, взятый у пациента. Взятый для анализа материал является выборочной пробой основной системы (кровь, спинно-мозговая жидкость и т. д.). Поэтому он должен быть получен таким образом, чтобы его свойства были репрезентативными для основной системы.

Медиана - значение, сочетающееся с положением в середине вариационного ряда результатов (50 перцентиль).

Метод исследования - основанный на существенных физических, химических, биологических свойствах предмета исследования принцип. способ его выделения, отделения, детекции. измерения.

Метод измерения (принцип) - комплекс теоретических положений и практических операций в общем виде, используемых при проведении измерений в соответствии с принятым принципом.

Методика измерений (процедура) - детальное описание практических операций и теоретических положений, используемых при проведении измерений в соответствии с принятым методом.

Метод дефинитивный (окончательный) - аналитический метод, имеющий наиболее высокую правильность и специфичность результатов измерения. Применяется для измерения концентраций первичных референтных материалов и отработки референтных методов.

Метод референтный - метод, проявляющий высокую аналитическую специфичность и правильность результатов измерений. Служит для сравнения аналитических методов. Результаты, полученные с помощью референтного метода, позволяют дать оценку отклонениям результатов анализа, полученным с помощью других методов, от наиболее вероятной величины.

Метод стандартный - выбранный путем систематического сравнения различных методов с учетом достоверной диагностической и аналитической надежности и технико-экономических условий его выполнения. Осуществляется по единым рабочим предписаниям, в стандартных условиях, которые были оптимизированы экспериментальным путем. Обеспечивает сопоставимость результатов исследований.

Микролимфоцитотоксическая проба - один из методов тканевого типирования гистосовместимости; основан на лизисе (разрушении) лимфоцитов дефибринированной крови, освобожденной от гранулоцитов и эритроцитов, под действием иммунных сывороток, обладающих цитотоксическими свойствами. Одним из вариантов микролимфоцитотоксической пробы является клеточно-опосредованный лимфолизис, принцип которого состоит в сенсибилизации лимфоцитов in vitro аллогенными антителами. Сенсибилизированный (активированный) лимфоцит приобретает способность лизировать аллогенные клетки - клетки -мишени в культуре, меченые ^{3}H. Результаты учитывают по количеству клеток-мишеней. подвергшихся лизису, либо по количеству радиоактивного изотопа,освободившегося из разрушенных клеток-мишеней.

Микрочипы лабораторные аналитические (микрочипные анализаторы, геносенсоры, микрототальные аналитические системы) - миниатюрные аналитические устройства, изготавливаемые из силикона, кварца, стекла, пластмасс с применением фотолитографии, реактивной ионной гравировки, сверления лучом лазера и других способов, заимствованных из технологий производства компонентов микроэлектроники. Перспективные средства лабораторного анализа.

Мода - значение, встречающееся в вариационном ряду результатов наиболее часто. Возможно наличие двух и более значений, встречающихся одинаково часто.

Надежность аналитическая - характеризуется воспроизводимостью, правильностью, аналитической чувствительностью, аналитической специфичностью и степенью подверженности интерферирующим факторам (нестабильностью метода). Испытание аналитической надежности не является идентичным контролю качества выполнения аналитического метода.

Нейтронно-активационный анализ - один из видов активационного анализа, основанный на облучении ядер химических элементов нейтронами, ядерных взаимодействиях и свойствах возбужденных (радиоактивных) ядер давать ионизирующее излучение или специфически поглощать или пропускать свет определенной длины волны. По параметрам радиоактивного излучения (энергия, период полураспада, интенсивность) или исследованию способности возбужденных ядер поглощать или пропускать свет определенного участка спектра (с помощью атомно-абсорбционной спектрофотометрии) проводят идентификацию элементов и их количественное определение.

Неправильность - числовая разница между средним значением результатов повторных определений одного и того же материала и должной или наиболее вероятной величиной (bias).

Нестабильность аналитического метода - характеризуется частотой грубых погрешностей, вызываемых трудно устраняемыми воздействиями, а также количеством результатов, которые находятся вне контроля во время испытаний аналитической надежности метода.

Нефелометрия - метод определения концентрации, размеров и (или) формы частиц веществ, находящихся в состоянии тонких взвесей, эмульсий или коллоидных растворов, путем измерения интенсивности их светорассеивания по количеству рассеянного света от пробы под углом, отличающимся от 0^0.

Нижний предел чувствительности аналитического метода - характеризуется концентрацией анализируемого компонента, которая соответствует наименьшему результату измерения, статистически достоверно отличающемуся от величины холостой пробы.

Нормальное значение (нормальная область значений) - значение (область значений) влияющей величины, устанавливаемое (устанавливаемая) в стандартах или технических условиях на средства измерений данного вида в качестве нормального (нормальной) для этих средств измерений.

Нормальное распределение - вариационный ряд случайных величин (результатов определений), характеризующийся непрерывной симметричной плавной кривой с пиком значений в ее центре. Математическими характеристиками нормального или Гауссова распределения служат среднее арифметическое значение ($\bar{x}$) и среднее квадратическое отклонение (S. мера дисперсии или разброса результатов в рамках распределения). Отклонения от средней охватывают примерно шесть средних квадратических отклонений (± 3 S). В графическом изображе-

нии кривая Гаусса имеет колоколообразную форму, вершина кривой соответствует среднему значению.

Обеспечение качества исследований - совокупность мер, позволяющих обеспечить соответствие результатов анализа требованиям их качества. В зависимости от сферы охвата и масштаба этих мер различают обеспечение качества в рамках лаборатории (охватывает преимущественно аналитический этап), в рамках учреждения, в составе которого работает лаборатория (охватывает преданалитический, аналитический и постаналитический этапы). в масштабах государственной и надгосударственной системы (включая систему стандартизации и контроля качества промышленного производства материальных средств анализа, систему стандартизации методов исследования, систему метрологического контроля используемых лабораториями средств измерений)

Обнаружение (наблюдение) - аналитическая процедура, позволяющая установить наличие в пробе биоматериала искомого компонента (аналита) и дать качественную или описательную характеристику.

Образец биологического материала (жидкости) - взятая у пациента для исследования порция биологической жидкости (крови, мочи, спинно-мозговой, синовиальной, амниотической, слезной, потовой, асцитической, плевральной жидкости, спермы) или иного биологического материала (пунктата органа, соскоба со слизистой оболочки, отделяемого носоглотки и т. п.).

Объект исследования (в клинической лаборатории) - образец, порция биоматериала, биожидкости, взятые у обследуемого пациента.

Определение (измерение) - аналитическая процедура, позволяющая количественно охарактеризовать аналит в пробе биоматериала, биожидкости. Термин „измерение" применим в клинической лаборатории со значительной долей осторожности, поскольку относительно биологических материалов, обладающих выраженной вариабельностью, измерительный процесс имеет существенные ограничения. На практике может быть измерено лишь значение аналитического сигнала, регистрируемого измерительным прибором при контакте с анализируемой пробой биоматериала. Однако, степень его связи с искомым аналитом порой весьма неопределенна. В процессе анализа сам аналит претерпевает некоторые преобразования, на результат определения влияет матрица биоматериала, а также другие компоненты биоматериала, в том числе различные интерференты; калибровка прибора осуществляется калибратором, нередко не совсем идентичным нативному аналиту и т. д.

Оптический тест (UV- тест, тест Варбурга) - вид абсорбционного фотометрического анализа, основанного на способности восстановленного никотинамидаденин-динуклеотида (NADH) поглощать свет в ультрафиолетовой области спектра (300-370 нм). Этот же принцип измерения может быть использован для реакций с образованием или расходованием восстановленного никотинамидаденин-динуклеотид-фосфата (NADPH). В зависимости от направленности реакции - образование или расходование NADH или NADPH - величина оптической плотности соответственно увеличивается или уменьшается.

Отсечная точка (cut-off point)- порог решения, применяемый при отбрасывании части результатов исследований, выходящих за референтные пределы, за пределы, принятые в результате статистической обработки серии результатов.

Ошибка измерения - см Погрешность.

Ошибка грубая - см. Погрешность грубая.

Планирование качества клинических лабораторных исследований - установление норм точности результатов исследований с учетом медицинских требований и реально достижимых с применением имеющихся в распоряжении лабораторий технических средств анализа, химических и биологических реагентов и расходных материалов при минимально необходимых затратах рабочего времени и лабораторных материалов.

Погрешность (ошибка) - статистически полученная степень отклонения результата по отношению к должной величине (ошибка выполнения метода) или по отношению к наиболее вероятной величине. Случайные ошибки характеризуются разбросом результатов, систематические - неправильностью, грубые - появлением значений вне установленных границ. Различные виды ошибок могут возникать одновременно.

Погрешность грубая - результат, который при выбранном уровне значимости лежит вне установленных пределов. Определенное по таким критериям значение не относят к числу приемлемых.

Погрешность измерения абсолютная - разность между результатом измерения и истинным (действительным) значением измеряемой величины.

Погрешность относительная - абсолютная погрешность, деленная на истинное (действительное) значение измеряемой величины.

Погрешность систематическая - составляющая погрешности измерения, которая в процессе измерений одной и той же величины остается неизменной или изменяется предсказуемым образом.

Погрешность случайная - составляющая погрешности измерения, которая при выполнении измерений одной и той же величины изменяется непредсказуемым образом.

Поляризация флюоресценции - измерение угла вращения плоскости поляризованного света флюоресценции.

Помехи - источники погрешностей физической, химической, биологической природы, присущие методам анализа, приборам, реагентам, биологическим материалам (аналог - „шум").

Пороги решения - пороговые значения результатов определения аналитов, при переходе за которые необходимо применять определенные врачебные меры в отношении обследуемого пациента; критерии существенных сдвигов в состоянии внутренней среды организма пациента.

Популяция - группа людей, по результатам обследования которых производится обобщение.

Правильность аналитического метода - характеризуется правильностью результатов, полученных этим методом.

Правильность измерений - качество измерений, отражающее близость к нулю систематических погрешностей в их результатах, т. е. соответствие среднего значения результатов измерений с истинной величиной измеряемого параметра.

Правильность результатов - соответствие среднего значения повторных определений одного и того же материала должной величине. Правильность не имеет числового выражения. Определяется неправильность, т. е. отклонение полученного результата от должной величины (bias).

Предел измерений - наибольшее или наименьшее значение диапазона измерений.

Предел определения - наименьшее количество аналита, которое может быть количественно измерено. Обычно определяют путем регистрации нулевого значения и выражают через среднее минимальное значение плюс 3 стандартных отклонения (при нормальном распределении).

Предельно допустимые значения погрешностей лабораторных исследований - установленные нормативным документом значения относительного аналитического смещения и общей аналитической вариации, которые не должны быть превышены при исследовании контрольных проб в первых 10 и 20 аналитических сериях при проведении внутрилабораторного контроля. Устанавливаются индивидуально для каждого аналита.

Предмет исследования (в клинической лаборатории) - компонент или группа компонентов пробы биоматериала пациента, отличающийся определенными физическими, химическими, биологическими свойствами.

Препаративный, пробоподготовительный прибор - техническое устройство, предназначенное для осуществления того или иного этапа подготовки пробы биоматериала для анализа, в т. ч. дозирующие устройства (пипетки, дозаторы, диспенсеры), устройства для отделения различных фаз биоматериала (пробирки с разделительным гелем, центрифуги, фильтры с различной величиной пор, хроматографические колонки и системы, электрофоретические устройства). устройства для создания заданных температурных режимов (холодильники, термостаты, водяные бани). Некоторые из этих устройств могут использоваться в аналитических процедурах (электрофорез, хроматография).

Пригодность - критерий оценки аналитических методов, который учитывает не только аналитическую надежность, но и информативность результатов в зависимости от области применения (экстренное исследование, текущий контроль, скрининг и т. д.)

Проба - аликвотная часть исследуемого или анализируемого материала, раствора, которая используется непосредственно для анализа.

Проба (смесь) анализируемая - состоит из пробы или контрольной пробы и реагентов. В случаях. когда добавление реактивов не производится, она состоит лишь из пробы или контрольной пробы.

Проба (смесь) холостая - проба для анализа, в которой отсутствует необходимый для развития реакции компонент или в которой тем или иным способом предотвращено течение реакции, ведущей к обнаружению/определению аналита.

Проба (смесь) эталонная - состоит из эталонного раствора и реактивов. Результат ее измерения применяется для вычисления результатов анализа.

Радиальная иммунодиффузия (РИД) - метод, основанный на образовании колец преципитации в результате взаимодействия специфических антител, содержащихся в геле, с анализируемым веществом (антигеном), помещенным в лунки стандартного размера. В результате диффузии в геле растворимых антител и антигенов кольцо преципитации образуется в зоне их оптимального соотношения. Площадь, ограниченная кольцом преципитации, является мерой количества антител, участвующих в реакции, и пропорциональна количеству антигена.

Радиоаллергосорбентный метод - радиоиммунологический метод определения в крови человека антител (например, иммуноглобулина Е

или компонентов классического пути активации комплемента) к разным видам аллергенов. Аллерген иммобилизуют на твердой основе (диски из фильтровальной или хроматографической бумаги, отсюда и другое название - **БРИСТ** - бумажный радиоиммуносорбентный тест), на которую наносят исследуемую биожидкость. В присутствии соответствующих антител образуется прочно связанный с основой комплекс аллерген-антитело. После удаления несвязавшихся антител к комплексу добавляют антитела сыворотки животных (например, кроликов) против определяемых антител, меченые ^{125}I. После удаления несвязавшихся антител подсчитывают радиоактивность дисков с фиксированным на них комплексом аллерген-антитело-анти-антитело - ^{125}I.

Радиоиммунологический анализ (РИА) - метод исследования взаимодействия антитела с антигеном, при котором в один из компонентов вводят радиоактивную метку (вид тестирования in vitro). Требует наличия специфических антител в качестве связывающего агента. Основан на законе действия масс, в соответствии с которым определяемое вещество конкурирует со своим меченым радиоактивным изотопом аналогом (антигеном) за ограниченное число мест связывания антитела до достижения химического равновесия компонентов реакционной смеси. Разновидность РИА - метод двойной системы антител, в котором комплекс антиген-антитело обрабатывают антиглобулиновой преципитирующей сывороткой (вторые антитела) с последующим отделением преципитата центрифугированием. Определение антигена с помощью меченых антител получило название иммунорадиометрического метода. Биожидкость смешивают с избытком меченых антител к исследуемому веществу и после инкубации удаляют непрореагировавшие антитела путем фиксации на твердофазном сорбенте. Количество меченых антител в надосадочой жидкости пропорционально содержанию исследуемого вещества. Вариант иммунорадиометрического метода - метод двойного связывания, в котором определяемый антиген образует комплекс с антителами, иммобилизованными на твердофазном сорбенте; после удаления свободного антигена добавляются меченые антитела, выявляющие комплекс. Радиоактивность образующегося комплекса антитело- антиген- меченое антитело служит мерой концентрации вещества.

Радиометрический анализ - совокупность методов определения качественного и количественного состава вещества, основанных на использовании радиоактивных изотопов, обычно вводимых в реактивы или образующихся в анализируемом веществе под действием жесткого облучения. Результаты радиометрического анализа получают по данным изме-

рения радиоактивности продуктов реакции с помощью радиометрических приборов.

Радиорецепторный анализ - разновидность радиохимического метода, основанного на конкурентном связывании меченого радиоактивным изотопом и немеченого (определяемого) компонента специфическими к нему мембранными или цитозольными рецепторами, которые могут быть частично очищенными, гомогенизированными или переведенными в растворимое состояние. Примеры рецепторов : рецепторы из семенников крыс (при определении ЛГ), рецепторы из микросомальной фракции гомогената ткани печени беременной крольчихи (при определении СТГ), специфические мембранные рецепторы из молочных желез беременной крольчихи (при определении пролактина), мембранные рецепторы из гомогената ткани почек морских свинок (при определении инсулина), специфические рецепторы из семенников половозрелых крыс (при определении ХГ) и др. Путем измерения радиоактивности осадков, образующихся после центрифугирования реакционной смеси (смесь содержит исследуемое вещество, его меченый радиоактивным изотопом аналог и специфические рецепторы к нему), определяют искомую концентрацию вещества.

Радиоферментный анализ - метод, основанный на превращении меченого радиоактивным изотопом субстрата в ходе специфической ферментативной реакции в вещество с той же радиоактивной меткой, которое определяют для измерения радиоактивности. Используется при определении веществ, содержащихся в малых (следовых) количествах.

Радиохимический анализ - совокупность методов определения качественного состава и количественного содержания радиоактивных изотопов в продуктах ядерных превращений. При проведении радиохимического анализа часто используют различные методы разделения и очистки веществ (соосаждение, хроматография, экстракция и др.).

Разброс (аналитическая вариация) - стандартное отклонение (S) или процентное выражение (коэффициент вариации. CV%) результатов повторных определений одного и того же материала. В процедуре внутрилабораторного контроля качества наиболее важными видами аналитической вариации являются внутрисерийная и общая аналитическая вариация, т. е. межсерийная с учетом внутрисерийной

Распределение Пуассона - предельный случай биноминального распределения случайных величин, в котором вероятность появления отдельного случайного значения крайне редка.

Раствор анализируемый - раствор, приготовленный из исследуемого или анализируемого материала способом, изменяющим его концентрацию, например, разбавлением, экстракцией, осаждением белков и т. п.

Раствор эталонный - раствор, который содержит установленное количество анализируемого компонента или результат измерения которого в эталонной пробе соответствует установленной концентрации анализируемого компонента. Применяется при приготовлении эталонной пробы.

Результат анализа - результат исследования анализируемого компонента.

Референтная (экспертная) лаборатория - лаборатория, официально аккредитованная для выполнения экспертных функций в отношении исследований определенных аналитов, располагающая соответствующим оборудованием, способная выполнять исследования определенных аналитов референтными методами с установленным уровнем точности.

Референтные пределы - пределы колебаний значений аналита, полученные при исследовании одного индивидуума или группы лиц, отобранных по специальным критериям. Референтные пределы, сочетающиеся с подтвержденным нормальным состоянием здоровья данного индивидуума или группы заведомо здоровых лиц одного пола, возрастной группы и т. д. могут использоваться для выявления отклонений значений аналита, обусловленных нарушением состояния здоровья. Референтные пределы могут также определяться в группе лиц, страдающих подтвержденным другими способами определенным видом патологии. Такие референтные пределы применяются для выявления соответствующей формы болезни. Референтные пределы в основном определяются факторами биологической вариации, если отношение $S^2_{ан}/S^2_{биол} < 0,4$. Применение референтных пределов, полученных в одной лаборатории, к интерпретации данных, полученных в другой лаборатории, возможно лишь применительно к аналогичной популяционной группе, форме патологии, а также при условии идентичности аналитических процедур и критериев аналитической надежности результатов.

Рефрактометрия - совокупность методов и средств определения концентрации веществ в растворах и твердых телах на основе измерения показателей преломления проходящего через них света на границе раздела двух сред.

Руководство по качеству - комплекс документов, содержащих описание действующей в лаборатории системы обеспечения качества и всех ее компонентов: нормативно-технического, методического, материально-техническо-

го обеспечения, описания процедур работы с объектами исследования, включая преданалитический, аналитический и постаналитический этапы, контроль качества результатов исследований и т. д. Руководство разрабатывается применительно к сфере деятельности данной лаборатории и выполнение изложенных в нем требований и процедур является обязательным.

Случайное отклонение результата - разность между результатом наблюдения и средним значением.

Смещение аналитическое - отклонение среднего арифметического значения результатов исследований в аналитической серии от установленного значения аналита в контрольном материале. Относительное аналитическое смещение - выраженное в процентах отношение абсолютной величины смещения к установленному значению в контрольном материале.

Совпадение ожидаемое - совпадение полученного результата анализа с ожидаемой величиной.

Спектрофотометрия - метод качественного и количественного анализа веществ, основанный на применении фотометрического анализа для измерения оптической плотности или коэффициента пропускания света веществом в монохроматическом свете. Измерения проводятся в узкой области спектра (выделяемой чаще всего монохроматором) - области максимального поглощения или пропускания света, что увеличивает точность количественного определения.

Спектрофотометрия атомно-абсорбционная - вид абсорбционного фотометрического анализа, основанный на измерении поглощения монохроматического света атомами веществ, испаряемых в пламени. Регистрация оптической плотности осуществляется так же, как в обычном спектрофотометре.

Специфичность аналитическая - способность аналитического метода обнаруживать и/или измерять те анализируемые компоненты, для обнаружения/определения которых он предназначен в присутствии других компонентов.

Специфичность антител - характеристика антител, которая обозначает их способность распознавать специфический антигенный детерминант в присутствии сходных структур. Чем выше специфичность, тем ниже перекрестная реактивность.

Среднее квадратическое отклонение результата измерения - параметр функции распределения результатов измерения, характеризующий их рассеивание и равный корню квадратному из дисперсии результата измерения (с положительным знаком).

Средства измерений - технические устройства, предназначенные для целей измерений, включающие материальные меры (пассивные измерительные устройства) и измерительные приборы (активные).

Средства лабораторного анализа - материальные предметы, используемые при исследовании биологических материалов : пробоподготовительные и аналитические приборы, химические и биологические реагенты, калибраторы, стандартные образцы и т. п.

Стабильность средства измерений - качество средства измерений, отражающее неизменность во времени его метрологических свойств.

Сходимость измерений - качество измерения, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполненных в одинаковых условиях (воспроизводимость в серии).

Тест клинический лабораторный - способ оценки состояния и функционирования определенного органа, системы организма пациента, основанный на исследовании в биоматериале отдельного аналита или группы аналитов. Может выполняться с помощью различных методов. на фоне активного воздействия на организм или в состоянии покоя.

Титриметрический анализ (титриметрия) - совокупность методов количественного химического анализа, заключающихся в измерении объема раствора реактива известной концентрации, расходуемого на реакцию с данным количеством (объемом) определяемого вещества. В титриметрическом анализе используются реакции нейтрализации, окисления-восстановления, осаждения, комплексообразования. Осуществляется путем титрования, конечную точку которого находят при помощи химических индикаторов или по резкому изменению какой-либо физической характеристики исследуемого раствора.

Точность измерений - качество измерений, отражающее близость их результатов к истинному значению измеряемой величины. Высокая точность измерений соответствует малым погрешностям всех видов, как систематических, так и случайных.

Турбидиметрия - один из видов абсорбционного фотометрического анализа, основанный на измерении поглощения или пропускания света частицами мутных растворов (тонких взвесей, эмульсий. коллоидных растворов). Измерения выполняются на фотоэлектрических колориметрах и спектрофотометрах.

Управление качеством клинических лабораторных исследований - комплекс взаимосвязанных мер на различных уровнях системы здраво-

охранения, включающий специальные функции планирования, обеспечения и контроля качества клинических лабораторных исследований.

Ферментные методы - методы определения концентрации веществ с использованием специфически действующих на них ферментов.

Ферментсвязывающий иммуносорбентный анализ (ELISA, enzyme - linked immunosorbent analysis) - гетерогенный ИФА, в котором для разделения связанного и свободного меченого антигена (антитела) используют антитела (антиген), закрепленные (иммобилизованные) на нерастворимом носителе(например, целлюлозе, сефадексе, сефарозе, агарозе, полистирене, латексе и др.) или на поверхности пробирок, лунок микроплат из полистирена, силиконовых трубок, шариков.

Флюоресценция - испускание фотона молекулой, которая пришла в возбужденное состояние под влиянием внешнего облучения. В процессах флюоресценции время между поглощением световой энергии и высвобождением ее в форме света составляет 10^{-8} - 10^{-4}с.

Флюорометрия - вид люминесцентного анализа, основанный на способности вещества поглощать свет определенной длины волны и излучать свет(люминесцировать) с большей длиной волны и меньшей энергией. Скоростная флюорометрия - измерение интенсивности флюоресценции в единицу времени (минуту, секунду).

Фотометрия - оптический метод количественного анализа, основанный на принципе измерения светового потока. Разновидности фотометрического анализа - абсорбционная (измерение интенсивности светового потока, проходящего через пробу биоматериала) и эмиссионная или пламенная (измерение интенсивности светового излучения, возникающего в пробе под влиянием высокой температуры пламени в результате перехода электронов атомов металлов с более высоких уровней на исходные с характерным для каждого металла эмиссионным спектром) фотометрия.

Хемилюминесценция - реакция, молекулы продукта которой находятся в возбужденном состоянии, вызванном энергией, высвобождаемой при этой реакции. Переход этих молекул в невозбужденное состояние приводит к испусканию фотона. Обычно квант низкий.

Хромогенные субстраты - соединения, способные под действием специфических ферментов расщепляться с образованием окрашенных веществ (например, п-нитробензилфосфат, N-α-бензоил- DL-аргинин- п - нитроанилид, Н - D-фенил-пипеколин - аргинин - п- нитроанилид и др.). Методы с использованием хромогенных субстратов - разновидность колориметрических методов.

Хроматографические методы - совокупность методов разделения и анализа смесей веществ, основанных на различном распределении компонентов между подвижной (газ или жидкость) и неподвижной (жидкость, твердый сорбент или их смесь) фазами. Компоненты образца движутся через хроматографическую систему только тогда, когда они находятся в подвижной фазе. В соответствии с типом подвижной и неподвижной фаз различают газовую хроматографию (подвижная фаза - газ), газожидкостную (подвижная фаза - газ, неподвижная - жидкость), жидкостную (обе фазы - жидкости).

Хроматография газожидкостная (ГЖХ) - хроматографический метод, в котором в качестве подвижной фазы используется газ; неподвижная фаза представляет собой инертный материал, покрытый нелетучей жидкостью, которым заполняется колонка. Исследуемые вещества продвигаются с газом-носителем по колонке. После выхода из колонки вещества попадают в детектор, электрический (или какой-либо другой) сигнал которого пропорционален количеству анализируемого вещества в токе газа-носителя. В качестве детекторов в газожидкостной хроматографии могут быть использованы : дифференциальный рефрактометр, ультрафиолетовый. полярографический, электрохимический, микроабсорбционный. пламенно-ионизационный детекторы, детектор флюоресценции, детектор электропроводности, детектор захвата электронов, масс-спектрометр.

Хроматография жидкостная высокопроизводительная (высокоскоростная, высокоразрешающая) - метод разделения веществ, основанный на принципах жидкостной хроматографии, при котором используются хроматографические колонки малого диаметра (1-3 мм) с размерами частиц твердого носителя не более 50 мкм. В качестве наполнителей колонок используют поверхностно-пористые насадки, состоящие из тонкого пористого слоя сорбента (содержащего твердое непроницаемое ядро), не деформирующиеся при высоком давлении. По мере прохождения с подвижной фазой через колонку исследуемые вещества адсорбируются на насадке, а затем элюируются. Элюирующая жидкость прокачивается через колонку с высокой объемной скоростью (около 1-5 мл/мин), что приводит к значительному перепаду давления в колонке. Этот метод хроматографии применяется для разделения веществ с молекулярной массой выше 300, термически нестойких, легко образующих ионы. Для количественного определения в этом виде хроматографического анализа чаще всего используют спектрофотометрию в ультрафиолетовой области, рефрактометрию, полярографию, измерение теплоты абсорбции.

Пламенно-ионизационные детекторы могут быть использованы после удаления элюирующих растворителей.

Хроматография ионообменная - вид хроматографического анализа, основанный на способности веществ к ионизации, обусловливающей суммарный положительный или отрицательный заряд соединения, и ионообменном равновесии между ионообменной смолой (неподвижная фаза) и электролитом(подвижная фаза), содержащим исследуемое вещество. Разделение веществ обычно проводят на колонках (колоночная хроматография), заполненных специальной ионообменной смолой. Существует два типа ионообменных смол : катионообменные и анионообменные. Отрицательно заряженные катионообменные смолы притягивают положительно заряженные молекулы исследуемых смесей веществ, а положительно заряженные анионообменные смолы притягивают отрицательно заряженные молекулы. Исследуемые соединения диффундируют внутрь гранул ионообменной смолы к ионообменному участку, обмениваются ионами с ионами смолы на этом участке, далее обмениваемые (исследуемого вещества) ионы диффундируют к поверхности ионообменника и десорбируются элюирующей жидкостью. В элюате из колонки проводят количественное определение колориметрическим, флюорометрическим или каким -либо другим методом.

Хроматография тонкослойная (ТСХ) - вид адсорбционной хроматографии, при которой разделение веществ происходит за счет установления адсорбционного равновесия между подвижной жидкой фазой и неподвижной твердой фазой (в качестве твердой фазы используют адсорбент, закрепленный в виде тонкого слоя на стеклянной пластинке или пленке из пластмассы). После нанесения пробы на пластинку или пленку с адсорбентом проводят разделение смеси веществ, поместив пластинку в камеру с растворителем. По мере продвижения растворителя по пластинке происходит разделение веществ (одномерная хроматография). В случае двухмерной хроматографии пластинку вынимают из камеры, высушивают, далее хроматографируют в другой системе растворителей в перпендикулярном к первому направлении. Положение вещества на пластинке после ТСХ определяют либо по флюоресценции пятен в ультрафиолетовом свете, либо по результатам опрыскивания пластинки специальными красящими веществами, действие которых основано на специфических цветных реакциях, и др. способами. Выделенные пятна соскабливают с пластинки, исследуемые вещества элюируют колориметрическим, флюорометрическим или каким -либо другим методом.

Центрифугирование в градиенте плотности - метод разделения веществ с помощью центрифугирования, основанный на различном поведении частиц в центробежном поле. При этом частицы, имеющие разную плотность, размеры и форму, осаждаются с разной скоростью. При наслаивании исследуемого образца на поверхность раствора с непрерывным градиентом плотности частицы в процессе центрифугирования распределяются вдоль градиента в виде дискретных зон или полос. Для создания градиента плотности используют растворы тяжелых металлов или сахарозы. Благодаря градиенту плотности удается избежать смешивания зон. Препаративное центрифугирование в градиенте плотности заключается в выделении биологического материала для последующих биохимических исследований; аналитическое центрифугирвание в градиенте плотности применяется для изучения чистых или практически чистых препаратов макромолекул или частиц.

Чувствительность аналитическая - способность аналитического метода выявлять наименьшее различие между двумя концентрациями анализируемого компонента. Она измеряется частным от деления разницы величин измерения на единицу концентрации анализируемой величины. Это частное прямо пропорционально чувствительности аналитического метода. Чувствительность рассматривают также как синоним порога обнаружения.

Электрофорез - метод разделения заряженных частиц при движении их в растворе под действием внешнего электрического поля. В зависимости от типов носителей, в которых происходит разделение веществ, различают электрофорез на бумаге, на ацетате целлюлозы, в геле (крахмала, агарозы, агара, полиакриламида), в тонком слое сорбента (окись алюминия, целлюлоза).Разделяемые вещества движутся в носителе в виде отчетливых зон(зональный электрофорез), которые обнаруживаются соответствующими аналитическими методами: окрашиванием красителем, элюацией и фотометрией (после электрофореза на бумаге), денситометрией (электрофорез на ацетате целлюлозы, в геле).

Электрохимические методы - совокупность методов качественного или количественного анализа, основанных на электрохимических явлениях, происходящих в исследуемой среде или на границе раздела фаз и связанных с изменениями структуры, химического состава или концентрации анализируемого вещества. Различают несколько разновидностей электрохимических методов. Потенциометрия объединяет методы, основанные на измерении электродвижущей силы обратимых электрохи-

мических цепей, когда потенциал рабочего электрода, погруженного в исследуемую жидкость, близок к равновесному значению. Кулонометрия объединяет методы анализа, основанные на измерении количества вещества, выделяющегося на электроде в процессе электрохимической реакции в соответствии с законами Фарадея. При кулонометрии потенциал рабочего электрода отличается от равновесного значения. Кондуктометрия объединяет методы, в которых измеряется электропроводность электролитов. Кондуктометрический анализ основан на изменении концентрации вещества или химического состава среды в межэлектродном пространстве. При этом потенциал рабочего электрода близок к равновесному значению.

Эталон - материальная мера, измерительный прибор или система, служащая для физической реализации, хранения или воспроизведения единицы измеряемой величины (их кратных или дольных частей) для того, чтобы передавать их другим средствам измерений путем сравнения.

Литература

1. Е. Н. Гаранина//Качество лабораторного анализа. Факторы, критерии и методы оценки. // М. Лабинформ, 1997. С. 16-18.

2. Клиническая оценка лабораторных тестов//Под ред. Н. Тица /Пер. с англ. - М. Медицина, 1986. С. 16-25.

3. Метрология. Термины и определения. ГОСТ 116263 -70.

4. Управление качеством клинических лабораторных исследований. Нормативные документы. // М. Лабпресс. 2000. С. 6-57.

ЕДИНИЦЫ СИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

В 1960 г. Генеральная конференция по мерам и весам приняла Международную систему единиц — СИ (Systeme Internationale — SI) как единую универсальную систему для всех отраслей науки, техники и производства. XXX сессия Всемирной ассамблеи здравоохранения, состоявшаяся в 1974 г., рекомендовала применять СИ во всех областях медицины, включая практическое здравоохранение. В основу СИ (табл. 1) положена метрическая система. Название системы происходит от греческого слова «метрон», что означает — мера. СИ состоит из единиц трех типов: основных (7), дополнительных (2), производных (табл. 2).

Таблица 1

Основные единицы СИ

Величина	***Единица***		
	наименование	**обозначение**	
		международное	**русское**
Длина	метр	m	м
Масса	килограмм	kg	кг
Время	секунда	s	с
Сила электрического тока	ампер	A	А
Термодинамическая температура	кельвин	K	К
Количество вещества	моль	mol	моль
Сила света	кандела	cd	кд

Таблица 2

Примеры производных единиц СИ

Величина	Единица		
	наименование	обозначение	
		международное	русское
Площадь	квадратный метр	m^2	$м^2$
Объем, вместимость	кубический метр	m^3	$м^3$
Давление	паскаль	Pa	Па
Удельный объем	кубический метр на килограмм	m^3/kg	$м^3/кг$
Массовая концентрация	килограмм на кубический метр	kg/m^3	$кг/м^3$
Плотность	килограмм на кубический метр	kg/m^3	$кг/м^3$
Молярная концентрация	моль на кубический метр	mol/m^3	$моль/м^3$
Моляльность (растворенного компонента)	моль на килограмм	mol/kg	моль/кг
Активность катализатора (фермента)	моль в секунду	mol/s	моль/с
Скорость химической реакции	моль в секунду на кубический метр	$mol(s.m^3)$	моль $(с.м^3)$

Дополнительные единицы — радиан и стерадиан.

Производные единицы образуются из основных в соответствии с правилами Международной системы единиц. Сочетая две или более основных единиц, путем умножения или деления можно получить производные единицы.

Сочетание основных единиц для образования производных иллюстрирует одно из основных преимуществ СИ. Внутри системы нет ни одного коэффициента перевода, кроме 1. Поэтому такая система называется когерентной (согласованной) системой. Некоторым производным единицам даны специальные названия — паскаль, ньютон, джоуль и др. Единицы СИ, как основные, так и производные, могут быть для практических целей неудобными по размерности. Поэтому в табл. 3 приводятся 16 приставок, при помощи которых возможно образование десятичных кратных и дольных единиц.

Таблица 3

Множители и приставки для образования десятичных кратных и дольных единиц и их наименований

Множитель	Приставка	Обозначение приставки		Множитель	Приставка	Обозначение приставки	
		международное	русское			Международное	русское
10^{18}	экса	E	Э	10^{-1}	деци	d	д
10^{15}	пета	P	П	10^{-2}	санти	c	с
10^{12}	тера	T	Т				
10^{9}	гига	G	Г	10^{-3}	милли	m	м
10^{6}	мега	M	М	10^{-6}	микро	m	мк
10^{3}	кило	k	к	10^{-9}	нано	n	н
				10^{-12}	пико	P	п
10^{2}	гекто	h	г	10^{-15}	фемто	f	Ф
10^{1}	дека	da	да	10^{-18}	атто	a	а

Наряду с единицами СИ допускается применение ряда единиц без ограничения срока наравне с единицами СИ, в том числе тонна, минута, час, сутки, литр. Другая группа единиц, не принадлежащих СИ, была принята Генеральной конференцией по мерам и весам для использования на ограниченный период времени: мм рт. ст., калория и др.

В клинической лабораторной диагностике Международную систему единиц рекомендуется применять в соответствии со следующими правилами.

1. В качестве единиц объема следует применять литр. Не рекомендуется в знаменателе применять дольные или кратные от литра (1 мл, 100 мл).

2. Концентрация измеряемых веществ указывается как молярная (моль/л) или как массовая концентрация (г/л).

3. Молярная концентрация используется для веществ с известной относительной молекулярной массой. Ионная концентрация указывается в виде молярной.

4. Массовую концентрацию используют для веществ, относительная молекулярная масса которых неизвестна.

5. Плотность указывается в г/л, клиренс — в мл/с.

6. Активность ферментов на преформированное количество веществ по времени и объему выражается как моль/(с.л); мкмоль/(с.л); нмоль/(с.л).

При переводе единиц массы в единицы количества вещества (молярные) коэффициент пересчета

$$K = \frac{1}{Mr}, \text{ где Mr — относительная молекулярная масса.}$$

При использовании данной формулы получаются следующие единицы количества вещества (табл. 4)

Таблица 4

Перевод единиц массы в единицы количества вещества

Исходная единица массы	Соответствующая единица количества вещества (молярная)
грамм (г)	моль (моль)
миллиграмм (мг)	миллимоль (ммоль)
микрограмм (мкг)	*микромоль (мкмоль)*
нанограмм(нг)	наномоль (нмоль)

Для удобства пересчета результатов анализов, выраженных в одной из систем единиц, в другую систему приводим табл. 5

Таблица 5

Перевод общепринятых единиц в единицы СИ и наоборот

Аналит/параметр	Общепринятые единицы	Коэффициент перевода		Единицы СИ
		в СИ	в общепр.ед.	
Адреналин	нг/л	5,46	0,183	пмоль/л
Адреналин (моча)	мкг/24часа	5,46	0,183	нмоль/сут
Адренокортикотропин	нг/л	0,220	4,541	пмоль/л
Альбумин	г/100 мл	10	0,10	г/л
Альдостерон	мг/100 мл	27,74	0,036	пмоль/л
Амикацин	мкг/мл	1,71	0,585	мкмоль/л
δ - Аминолевулиновая кислота	мг/24часа	7,626	0,131	мкмоль/сут
Аммиак	мг/100 мл	0,587	1,703	мкмоль/л
3'-5'-циклический АМФ	нг/мл	3,04	0,329	нмоль/л
Аскорбиновая кислота	мг/100 мл	56,78	0,0176	мкмоль/л
Ацетилсалициловая кисл.	мг/л	0,00724	138	ммоль/л
Белок	мг/100 мл	10,0	0,1	г/л
Белок (моча)	мг/г креатинина	0,113	8,85	г/моль креатинина
Билирубин	мг/lW мл	17,1	0,0585	мкмоль/л
Вальпроевая кислота	мг/л	6,93	0,144	мкмоль/л
Ванилилминдальная кисл.	мг/24часа	5,03	0,199	мкмоль/сут
Ванкомицин	мкг/мл	0,690	1,449	мкмоль/л
Витамин А	мкг/100 мл	0,0349	28,65	мкмоль/л
Витамин B_1	мкг/100 мл	33,3	0,03	нмоль/л
Витамин B_6	нг/мл	3,82	0,262	нмоль/л
Витамин B_{12}	мг/100 мл	0,738	1,355	мкмоль/л
Витамин С	мг/100 мл	56,78	0,0176	мкмоль/л
25-гидрокси-Витамин Д	нг/мл	2,50	0,401	нмоль/л
Витамин Е (α - токоферол)	мг/100 мл	23,2	0,043	мкмоль/л
Галактоза	мг/100 мл	0,0555	18,02	ммоль/л
Галактоза (моча)	мг/24 часа	0,0055	180,2	ммоль/сут
Гаптоглобин	мг/100 мл	0,0100	100,00	г/л
Гемоглобин	мг/100 мл	0,621	1,61	мкмоль/л

Аналит/параметр	Общепринятые единицы	Коэффициент перевода		Единицы СИ
		в СИ	в общепр.ед.	
Гентамицин	мкг/мл	2,09	0,478	мкмоль/л
5 Гидроксиндолилуксусная кислота	мг/24часа	5,23	0,191	мкмоль/сут
17 – Гидроксикортикостероиды	мг/100 мл	27,59	0,036	мкмоль/л
17 – Гидроксипрогестерон	нг/мл	3,03	0,330	нмоль/л
Гидроксипролин	мг/л	7,626	0,131	мкмоль/л
Глицерин	мг/100 мл	0,109	9,209	ммоль/л
Глюкоза	мг/100 мл	0,0555	18,02	ммоль/л
Гомоцистеиновая кислота	мг/л	7,41	0,135	мкмоль/л
Дигитоксин	мкг/л	1,31	0,763	нмоль/л
Дигоксин	мкг/л	1,28	0,781	нмоль/л
Дизопирамид	мг/л	2,95	0,339	мкмоль/л
Дофамин	нг/л	6,54	0,153	пмоль/л
Дофамин (моча)	мкг/24часа	6,54	0,153	нмоль/сут
Железо	мкг/100 мл	0,179	5,59	мкмоль/л
Железо (моча)	мкг/24часа	0,0179	55,9	мкмоль/сут
Железосвязывающая способность	мкг/100 мл	0,179	5,59	мкмоль/л
Инсулин	мкЕд/мл	7,241	0,138	пмоль/л
Калий	мг/100 мл	0,256	3,91	ммоль/л
Кальций	мг/100 мл	0,250	4,01	ммоль/л
Кальций (моча)	мг/24часа	0,025	40,1	ммоль/сут
Кальций (моча)	мг/г креатинина	0,00282	355	моль/моль креатинина
Кальцитонин	мг/л	0,28	3,57	пмоль/л
Карбамазепин	мг/л	4,23	0,236	мкмоль/л
Каротин	мкг/100 мл	0,0186	53,69	мкмоль/л
Копропорфирины	мкг/л	1,527	0,655	нмоль/л
Кортизол	мкг/100 мл	0,0276	36,25	мкмоль/л
Кортизол (моча)	мг/24часа	2,76	0,363	нмоль/сут

Аналит/параметр	Общепринятые единицы	Коэффициент перевода		Единицы СИ
		в СИ	в общепр.ед.	
Кофеин	мкг/мл	5,15	0,194	мкмоль/л
Креатин	мг/100 мл	76,25	0,0131	мкмоль/л
Креатин (моча)	мг/24часа	0,0753	131	ммоль/сут
Креатинин	мг/100 мл	88,4	0,0113	мкмоль/л
Креатинин (моча)	г/24часа	8,84	0,113	ммоль/сут
Лактат	мг/100 мл	0,111	9,008	ммоль/л
Лейцин	мг/100 мл	76,3	0,0131	мкмоль/л
Лецитин	мг/100 мл	12,5	0,080	мкмоль/л
Лидокаин	мг/л	4,27	0,234	мкмоль/л
Магний	мг/100 мл	0,411	2,431	ммоль/л
Магний (моча)	мг/24часа	0,0411	24,31	ммоль/сут
Магний (моча)	*мг/г креатинина*	*0,00465*	*215*	*моль/моль* креатинина
Медь	мкг/100 мл	0,157	6,354	мкмоль/л
Медь(моча)	мг/24часа	0,0157	63,54	мкмоль/сут
Метгемоглобин (Hb/4:M = 16114,5)	мг/100 мл	621,1	0,0016	мкмоль/л
Миоглобин	мг/100 мл	0,585	1,71	мкмоль/л
Мочевая кислота	мг/100 мл	59,5	0,0168	мкмоль/л
Мочевая кислота (моча)	г/24часа	5,95	0,168	ммоль/сут
Мочевая кислота (моча)	мг/г креатинина	0,00067	1487	моль/моль креатинина
Мочевина	мг/100 мл	0,167	6,006	ммоль/л
Мочевина (моча)	*г/24часа*	*16,7*	*0,06*	*ммоль/сут*
Мочевина (моча)	г/г креатинина	1,88324	0,531	моль/моль креатинина
Натрий	мг/100 мл	0,435	2,30	ммоль/л
Натрий (моча)	*г/г креатинина*	*4,90*	*0,204*	*моль/моль* креатинина
Норадреналин	нг/л	5,91	0,169	пмоль/л
Норадреналин (моча)	мг/24часа	5,91	0,169	нмоль/сут
Оксалат (моча)	мг/24часа	11,4	0,088	мкмоль/сут
Оксигемоглобин	%	0,0100	100,00	1

Аналит/параметр	Общепринятые единицы	Коэффициент перевода		Единицы СИ
		в СИ	в общепр.ед.	
Пируват	мг/100 мл	113,6	0,0088	мкмоль/л
Порфирин (моча)	мкг/24часа	1,2	0,833	нмоль/сут
Порфобилиноген	мг/л	4,42	0,226	мкмоль/л
Примидон	мг/л	4,58	0,218	мкмоль/л
Прогестерон	нг/мл	3,18	0,314	нмоль/л
Прокаинамид	мг/л	4,23	0,236	мкмоль/л
Пролактин	нг/мл	27,6	0,0362	мЕд/л
pC02	мм рт.ст.	0,133	7,502	кРа
p02	мм рт.ст.	0,133	7,502	кРа
Ртуть	мкг/л	0,0050	200,60	мкмоль/л
Салицилат	мг/л	0,00724	138	ммоль/л
Свинец	Мкг/100 мл	0,0483	20,72	мкмоль/л
Селен	мкг/л	0,0127	78,96	мкмоль/л
Сорбитол	мг/100 мл	54,9	0,018	мкмоль/л
Таллий	мкг/д	5,92	0,169	нмоль/л
Тестостерон	нг/мл	3,47	0,288	нмоль/л
Теофиллин	мг/л	5,55	0,180	мкмоль/л
Тироксин (Т4)	мкг/100 мл	12,87	0,078	нмоль/л
Тироксин свободный (FT4)	мг/100 мл	12,87	0,078	пмоль/л
Тироксинсвязывающий глобулин	мкг/мл	1	1	мг/л
Тобрамицин	мг/л	2,14	0,467	мкмоль/л
Трансферрин	мг/100 мл	0,114	8,80	мкмоль/л
Триглицериды	мг/100 мл	0,0114	87,5	ммоль/л
Трийодтиронин (Т3)	нг/мл	1,536	0,651	нмоль/л
Трийодтиронин свободный(FT3)	пг/мл	1,536	0,651	пмоль/л
Уробилиноген	мг/100 мл	16,9	0,059	мкмоль/л
Фенилаланин	мг/100 мл	0,061	16,5	ммоль/л
Фенитоин	мг/л	3,96	0,252	мкмоль/л
Фенобарбитал	мг/л	4,31	0,232	мкмоль/л
Ферритин	нг/л	1	1	мкг/л
Флоорид	мкг/л	0,053	19,0	мкмоль/л
Фолиевая кислота	мкг/100 мл	22,66	0,0441	нмоль/л
Фосфат неорганический	мг/100 мл	0,3229	3,097	ммоль/л

Аналит/ параметр	Общепринятые единицы	Коэффициент перевода		Единицы СИ
		в СИ	в общепр.ед.	
Фосфат (моча)	г/24часа	32,3	0,031	ммоль/сут
Фосфат (моча)	мг/г креатинина	0,00361	277	моль/моль креатинина
Фосфолипиды	мг/100 мл	0,0129	77,52	ммоль/л
Фруктоза	мг/100 мл	0,0555	18,02	ммоль/л
Фруктоза (моча)	мг/24часа	0,0055	180,2	ммоль/сут
Хинидин	мг/л	3,08	0,325	мкмоль/л
Хлориды	мг/100 мл	0,282	3,545	ммоль/л
Хлориды (моча)	г/г креатинина	3,18	0,314	моль/моль креатинина
Хлорамфеникол	мкг/мл	3;09	0,323	мкмоль/л
Холестерин	*мкг/100 мл*	0,026	*38,66*	*ммоль/л*
Церулоплазмин	мкг/100 мл	0,0625	16	мкмоль/л
Цистин (моча)	мг/24часа	8,34	0,12	мкмоль/сут
Цинк	мкг/100 мл	0,153	0,537	мкмоль/л
Цитрат	мкг/100 мл	52,1	0,019	мкмоль/л
Цитрат (моча)	мг/24часа	0,0052	192	ммоль/сут
Эстрадиол	пг/мл	3,67	0,272	пмоль/л
Эстриол	мкг/100 мл	34,68	0,0288	нмоль/л
Эстрон	мкг/100 мл	3,698	0,270	нмоль/л
Этанол	мг/100 мл	0,217	4,608	ммоль/л
Этосуксимид	мг/л	7,08	0,141	мкмоль/л

Коэффициенты перевода единиц активности ферментов

Единица	Коэффициент	Единица
мккат/л	60	Ед/л
нкат/л	0,06	Ед/л
Ед/л	0,0167	мккат/л
Ед/л	16,67	нкат/л

Соответствие единиц

1 мккат/л = 1 мкмоль/(с.л) 1 мкмоль/мин = 16,67 нкат

1 нкат/л = 1 нмоль/(с.л) 1 мкмоль/мин = 1 Ед

Литература

- ГОСТ 8.417-81. Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы физических величин. — М.: Изд-во стандартов, 1982. — 40 с.

- Единицы СИ в медицине / Пер. с англ. — М.: Медицина, 1979. — 85 с.

- Лабораторные методы исследования в клинике / Справочник. — Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — С. 9—10.

- Хейль В., Шуклис Ф., Цавта Б./ Референтные пределы у взрослых и детей. Преаналитические предосторожности. — М., 1996. — С. 110—117.

- W.Heil, R.Koberstein, B.W.Zawta. /-Reference Ranges for Adults and Children - *Mannheim, 2000. - pp.146-158*

ЭЛЕМЕНТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

I. Организация рабочих мест в лаборатории

Лабораторная мебель.

Как и любой труд, лабораторная работа должна быть рационально организована, начиная с учитывающей требования эргономики организации рабочих мест сотрудников лаборатории для эффективного выполнения ими пробоподготовительных и аналитических процедур. По характеру трудовых процессов и уровню механизации рабочие места подразделяются на предназначенные для ручной работы и для работы с использованием средств механизации и автоматизации.

Пробоподготовительные процессы и , соответственно, отдельные рабочие места для них, включают :

1) Прием биоматериалов (в ряде случаев взятие образцов биоматериалов у пациентов производится также непосредственно в лаборатории);

2) Регистрацию, кодирование и разметку образцов; здесь же по окончании выполнения исследований может производиться оформление и регистрация результатов исследований;

3) Первичную обработку образцов биоматериалов: термостатирование, центрифугирование, отделение сыворотки, окраску мазков крови, дозирование отдельных проб для определенных видов исследований и т.д.

Хотя пробоподготовительные процедуры, казалось бы, отдалены от окончательного результата лабораторного исследования, они имеют принципиальное значение для успешной деятельности лаборатории, поскольку в значительной мере определяют этот успех, а при небрежном осуществлении - неудачу.

Так, на протяжении всего аналитического процесса должна быть обеспечена идентичность образца для того, чтобы результаты анализа отражали состояние организма - источника этого образца. В противном случае результат исследования не только теряет рациональное значение, но и может вызвать негативные последствия: врачебные ошибки, неправомерные медицинские меры, ущерб здоровью пациента.

Эта идентичность обеспечивается:

на преаналитическом этапе- четкой регистрацией образцов биоматериалов и идентификацией их с источником - пациентом;

на аналитическом этапе- единой маркировкой емкостей, в которых проходит весь процесс подготовки и анализа пробы;

на постаналитическом этапе- сопоставлением результатов данного анализа с результатами параллельно выполненных других анализов из того же образца, а также с результатами ранее проведенных аналогичных исследований у того же пациента.

Несоблюдение точно заданных правил подготовки пробы (длительное хранение при неблагоприятных температурных условиях, задержка с отделением клеточных элементов от жидкой части крови, нарушение условий центрифугирования) может привести к частичному разрушению искомого аналита, что вызовет извращение результата исследования.

Это определяет необходимость организации и оснащения рабочих мест, где выполняются пробоподготовительные процедуры, на том же уровне, что и рабочие места для аналитических процедур.

Желательно, чтобы персонал клинических отделений, доставляющий образцы биоматериалов не входил в помещение лаборатории, а передавал контейнеры с образцами через специальное окно, возле которого внутри помещения лаборатории первоначально располагается поступающий материал. Рабочее место для приема проб должно иметь достаточное пространство для размещения поступающих в лабораторию образцов биоматериалов, удобного манипулирования с ними и сортировки по видам исследований, причем разные виды биоматериалов (кровь, моча, кал и т.д.) должны размещаться отдельно. Обычно из каждого образца некоторая часть оставляется в запасе до конца рабочего дня в холодильнике, чтобы иметь наготове материал для повторного исследования при обнаружившихся дефектах выполнения анализа. Кроме того, здесь же должен располагаться запас посуды для сбора образцов биоматериалов, которая может выдаваться в клинические подразделения для сбора образцов в последующем. Посуда должна храниться в шкафах, которыми оборудуется *либо помещение для приема проб, либо расположенное поблизости* отдельное помещение, специально приспособленное для хранения расходных материалов. Для мытья посуды многоразового пользования должны быть оборудованы мойки или размещена посудомоечная ультразвуковая машина.Если предусмотрен сбор образцов крови у пациентов непосредственно в лаборатории, то должно быть выделено и обору-

Рис. 1. Рабочее место для взятия образца крови у пациента в лаборатории.

довано по типу процедурных кабинетов соответствующее рабочее место, желательно в отдельном помещении (рис. 1).

При немеханизированном учете образцы биоматериалов регистрируются в журнале регистрации и каждому образцу присваивается свой кодовый идентификационный номер, под которым впоследствии порции образца, т.е. пробы (аликвоты) подвергаются назначенным врачом исследованиям. Маркирование пробирок с пробами биоматериала может осуществляться путем нанесения на них надписей фломастером. В компьютеризированной лаборатории соответствующая информация о пациенте и код его биоматериала вносятся в компьютерный журнал. Рациональным способом маркировки является печатание и нанесение на пробирки с пробами идентификационного штрих-кода, который может считываться лаборантами на последующих этапах обработки и анализа проб с помощью специальных ридеров (рис.2). В этом случае на рабочем месте регистратора должно быть устройство для печати штрих-кодов. Еще более высокотехнологичный способ - это система CLIDS, в которой регистрация, т.е. запись паспортных данных пациента и перечня назначенных врачом пациенту лабораторных исследований, осуществляется непосредственно в клиническом отделении при взятии у пациента образца биоматериала медицинской сестрой, которая фиксирует эти данные с помощью ручного дистанционного терминала больничной информационной системы и вносит их тем самым в память больничного ком-

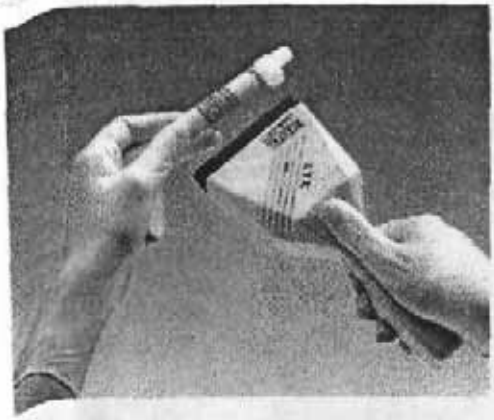


Рис.2. Считывание штрих-кода ручным детектором.

пьютера с помощью беспроводной связи. Та же информация вносится прикосновением антенны терминала к основанию кюветодержателя в память вмонтированного там электронного микрочипа, служащего носителем идентификационной информации, выполняющей одновременно роль сигнала к выполнению запрограммированных исследований. В этой системе регистрация данных о пациенте и его идентификационный код считывается автоматически из микрочипа кюветодержателя при его доставке в лабораторию (рис.3).Лабораторная информационная система фиксирует полученные при исследовании проб результаты, объединяет их в соответствии с номерами идентификационных кодов и выдает сводные отчеты по каждому пациенту в виде распечаток или передает данные через больничную информационную систему непосредственно в клиническое отделение, где они вносятся в электронную историю болезни соответствующего пациента.

Рабочие места для выполнения процедур первичной обработки проб, оснащенные средствами механизации: встряхивателями, центрифугами, дозаторами, устройствами для окраски мазков крови и т.п., должны быть организованы в соответствии с требованиями эргономики и удобства использования различных устройств. В зависимости от размеров оборудования такие рабочие места могут быть предназначены как для работы сидя, так и для работы стоя (например, возле напольной центрифуги). В автоматизированной лаборатории пробоподготовительные устройства - центрифуга, устройство для откупоривания пробирок, устройство сортировки образцов по видам исследований, диспенсер, маркировочное устройство - могут быть подключены к единому конвейеру , по которому

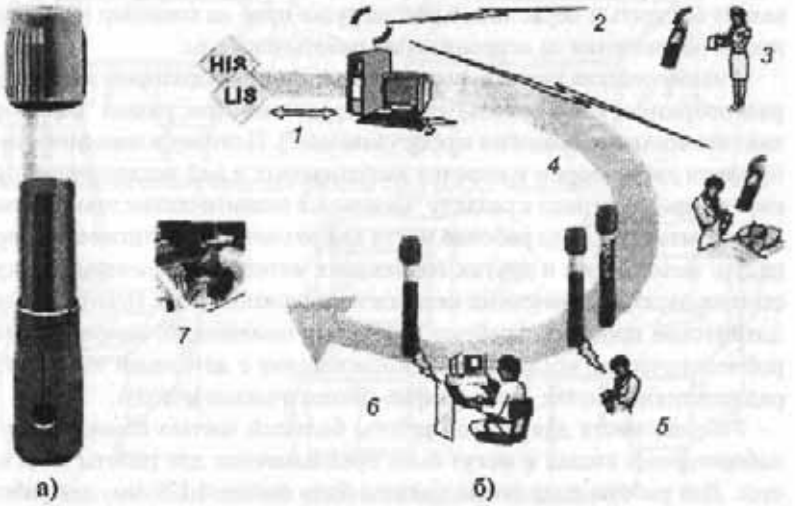


Рис. 3. *Использование системы CLIDS для управления сбором, идентификацией, подготовкой и исследованием проб биоматериалов (публикуется с разрешения "Labsystems").*

а) Держатель для пробирок системы CLIDS с встроенным в основание микроэлектронным чипом.

б) Схема использования системы CLIDS :

1- сервер CLIDS - управление системой, контроль за сбором образцов, слежение за пробоподготовкой и аналитическим процессом; 2 - беспроводная связь между сервером и терминалом; 3 - ручной терминал для внесения сведений о пациентах и назначенных им лабораторных исследованиях; 4 - взятие образцов биоматериалов у пациентов и сообщение серверу с помощью ручного терминала сведений о пациентах, взятых образцах биоматериала, отметка о необходимости срочного выполнения исследований; 5 - идентификация проб - внесение в память электронного чипа держателя пробирки необходимых идентификационных сведений и дополнительной информации(требований правильного выполнения лабораторных процедур); 6 - сведения об образце биоматериала, поступившем в лабораторию, вводятся в лабораторную информационную систему; 7 - по программе, записанной в память электронного чипа, образец биоматериала, помещенный в конвейер автоматизированной лаборатории, подвергается обработке и аналитическим процедурам; результаты исследований автоматически поступают в банк данных лабораторной информационной системы.

перемещаются контейнеры с пробами (рис. 4). Работа персонала при этом может состоять в первоначальной загрузке проб на конвейер и последующем наблюдении за исправностью работы системы.

Аналитические процедуры в современной лаборатории достаточно разнообразны , как и используемое оборудование (см. раздел "Основные аналитические технологии и оборудование"). Поэтому в зависимости от профиля лаборатории и перечня выполняемых в ней исследований (см. справочный материал к разделу "Основные аналитические технологии") могут быть выделены рабочие места для различных аналитических процедур: фотометрии и других оптических методов определения, микроскопии, электрохимических методов исследования и т.п. Некоторые аналитические процессы требуют отдельных помещений: например, микробиологические исследования, исследования с детекцией аналитов по радиоактивной метке, молекулярно-биологические методы.

Рабочие места для ручной работы большей частью оборудуются на лабораторных столах и могут быть предназначены для работы сидя или стоя. Для работы сидя столы должны быть высотой 170 мм, для работы стоя - 900 мм. Ширина стола 600 или 800 мм. Лабораторные столы, в зависимости от общей организации рабочих процессов в лаборатории, могут быть приставлены к стене, быть островными или полуостровными, оборудованы настольными стеллажами, иметь тумбы с полками или выдвижными ящиками (рис.5,6,7,8). Стулья желательно иметь с возможностью регулировки по высоте сиденья и угла наклона спинки (рис. 9), а также с регулировкой по высоте подставки для ног. Для каждой методики (или для

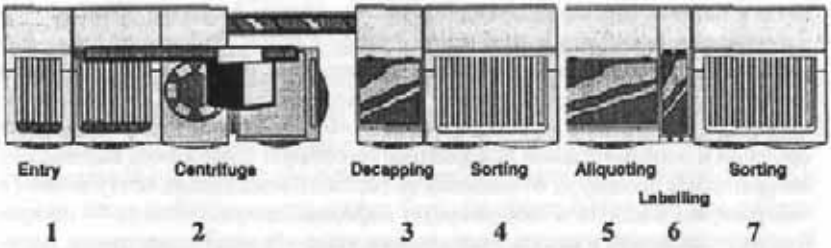


Рис.4. Схема автоматизации рабочих мест для пробоподготовки.
1 - ввод пробы; 2 - центрифугирование; 3 - откупоривание пробирок; 4 - сортировка проб; 5 - дозирование аликвот; 6 - маркировка аликвот; 7 - сортировка аликвот.

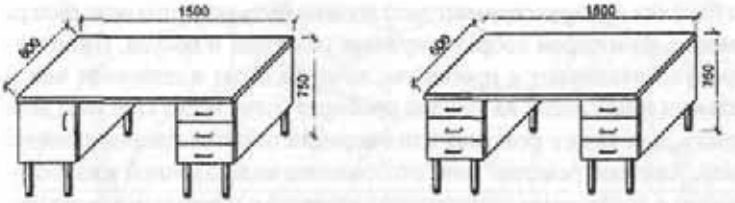


Рис.5. Лабораторный стол для работы сидя (ООО "БиоЛайн").

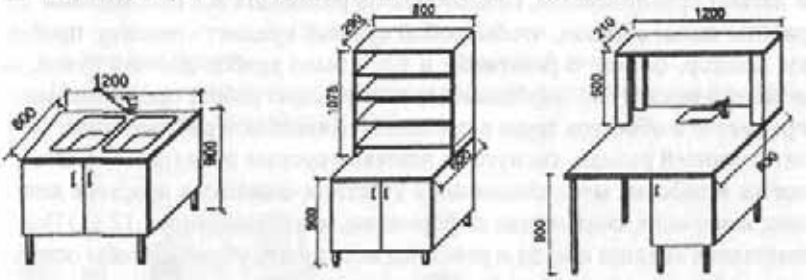


Рис.6. Лабораторный стол для работы стоя.(ООО "БиоЛайн").

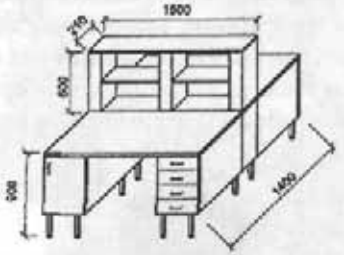


Рис.7. Островной лабораторный стол на 2 рабочих места (ООО "БиоЛайн").

Рис.9. Стул с регулировкой высоты сиденья и угла наклона спинки (ООО "БиоЛайн").

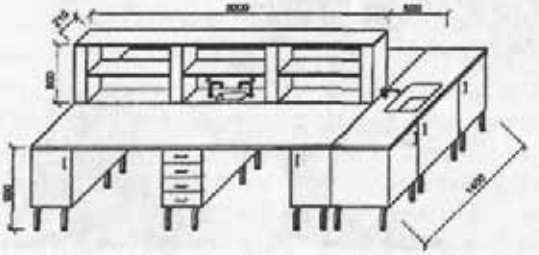


Рис.8. Островной лабораторный стол на 4 рабочих места (ООО "БиоЛайн").

группы близких по характеру методик) должно быть подготовлено свое рабочее место, на котором собраны нужные реактивы и посуда. Пипетки и дозаторы устанавливают в пробирках, которые стоят в штативах или на специальных подставках; на каждой пробирке (или гнезде штатива) делают надпись, для какого реактива или операции пипетка предназначается: например, "цветной реактив" или "отсасывание надосадочной жидкости". На флаконы с реактивами приклеивают этикетки с названиями реактивов и датами приготовления. Целесообразно размещать все необходимое для работы таким образом, чтобы любой нужный предмет - пипетку, пробирку, дозатор, флакон с реактивом и т.п. - было удобно достать рукой, не вставая с места (рис. 10).Наименее утомительна работа при размещении предметов и объектов труда в пределах оптимальной рабочей зоны, соответствующей размаху согнутой в локтевом суставе руки (рис. 11). Это касается и рабочих мест, связанных с участием человека в процессе детекции, измерения, считывания информации, микроскопии(рис.12,13) После окончания анализа посуда и реактивы могут быть убраны, чтобы освободить рабочую поверхность стола для других работ.

Для некоторых лабораторных производственных процессов рабочие места должны соответствовать особым требованиям. Так, работа с агрессивными жидкостями должна проводиться в вытяжных шкафах для предупреждения вредного воздействия этих веществ на работников лаборатории.(рис.14).Такие шкафы должны иметь рабочую поверхность из кисло-

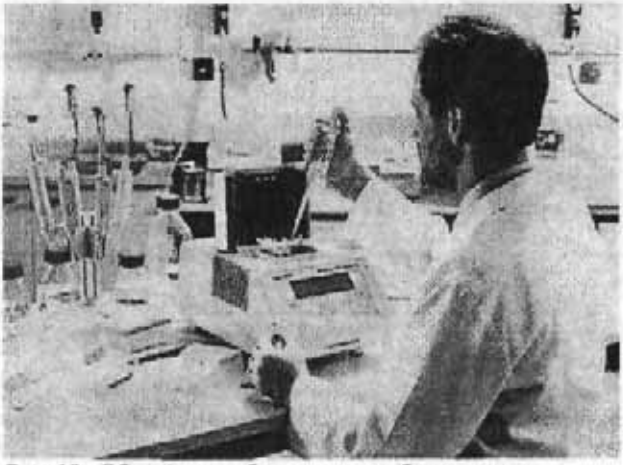


Рис. 10. Общий вид лабораторного рабочего места.

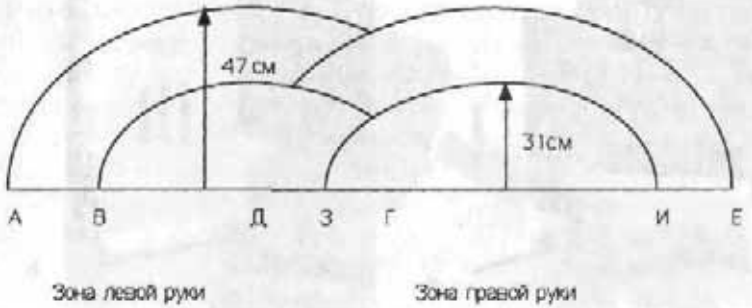
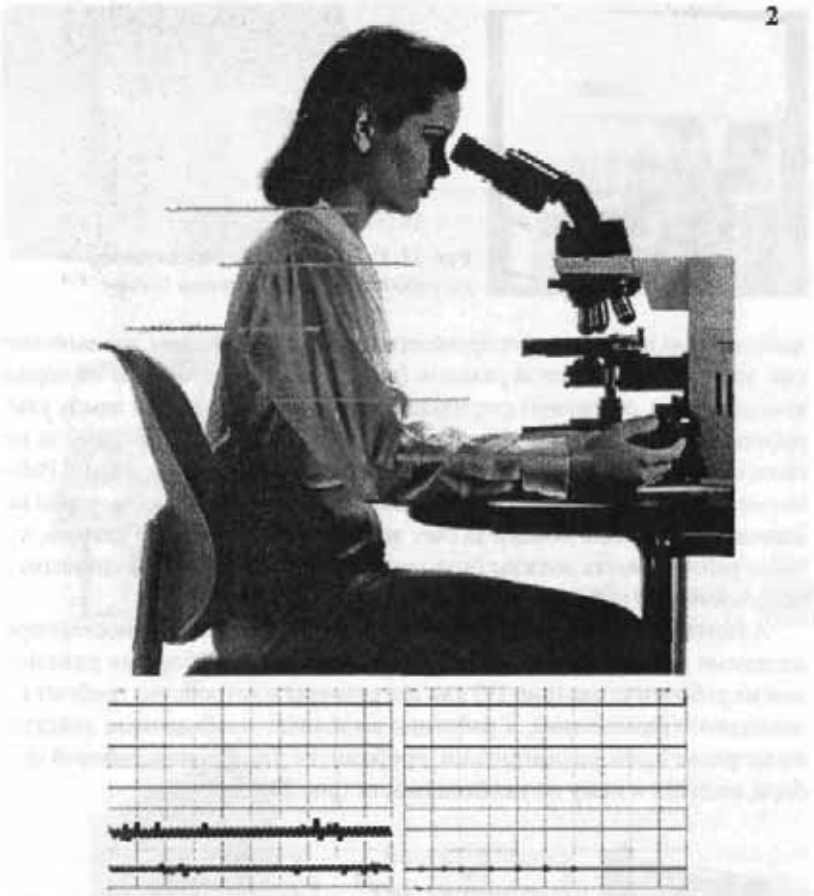


Рис. 11. Схема организации лабораторного рабочего места: оптимальные рабочие зоны для правой и левой руки.

Рис. 12. Общий вид рабочих мест для микроскопии.

тощелочестойкой керамической плитки, защитное стекло с системой противовесов для фиксации в любом положении, осветитель рабочей зоны с выключателем, раковину из нержавеющей стали или керамики, в случае необходимости - осевой вентилятор (рис. 15). Работа с микробными культурами должна производиться в боксе или в специально оборудованном боксированном шкафу (рис.16). Для работы с объектами, требующими стерильной рабочей зоны, используются ламинарные шкафы с вертикальным потоком воздуха (рис. 17), оснащенные фильтрами, вентилятором с плавной регулировкой скорости вращения и т.п.Настольные боксы с вертикаль-

Рис. 13. Эргономика работы с микроскопом. *1.* Усовершенствование конструкции микроскопов серии BX фирмы "Olympus" (Япония) облегчает трудовое напряжение микроскописта и снижают степень физической усталости: **a.** Удобное расположение верньеров и других объктов управления микроскопом уменьшает необходимость движений руками; **b.** Все управление электрической частью сосредоточено в правой стойке станины микроскопа, что позволяет одним движением руки отрегулировать освещенность препарата; для визуального контроля за манипуляциями на этой панели взгляд лабораторного работника лишь слегка отклоняется от окуляра. **c.** Конструкция микроскопа позволяет работнику сохранять оптимальное прямое положение тела при различных видах работы, в том числе при использовании счетчика клеток, при фотографировании препарата. **d.** Конструкция окуляра позволяет гибко варьировать его положение в пределах от 5 до 35 градусов для удобства наблюдателя. **e.** Вмонтированные в основание микроскопа светофильтры быстро и легко меняются.



2. Объективная сравнительная оценка напряжения в различных группах мышц микроскописта при работе на микроскопах различной конструкции. Запись электромиограмм с пяти групп мышц, слева - миограммы при работе на обычных микроскопах, справа - при работе на усовершенствованном микроскопе серии BX фирмы "Olympus". Более высокая амплитуда миограммы указывает на большее напряжение мышцы, менее высокая - на меньшее напряжение. Сверху вниз: Erector spinae - минимальное напряжение в верхней части спины. Occipitalis - оптимальное расположение окуляра по отношению к глазам наблюдателя исключает напряжение шейных мышц. Deltoid - расслабленное положение тела может поддерживаться минимальным напряжением плеч. Biceps, Abd. pol. brev. - локти могут находиться на поверхности стола, что уменьшает напряжение предплечий.

Рис. 14. Рабочее место с расположением рабочей зоны в вытяжном шкафу.

ным потоком воздуха могут применяться на рабочих местах для выполнения полимеразной цепной реакции (рис. 18). Они изготовлены из нержавеющей стали, сохраняют стерильность рабочей зоны, имеют лампу ультрафиолетового света, инактивирующую все молекулы РНК/ДНК за несколько минут, располагают внутренним освещением рабочей зоны. Рабочее место для взвешивания должно размещаться таким образом, чтобы исключить возможные помехи за счет вибрации опоры весов. Понятно, что такие рабочие места должны быть постоянными и всегда быть готовыми к использованию по мере необходимости.

Автоматизированные рабочие места могут иметь особенности, определяемые конструкцией приборов: предназначен прибор для размещения на рабочем столе (рис.19) или его размеры и устройство требуют его напольного размещения, а работник выполняет необходимые действия по заправке прибора реагентами, пробами, по управлению работой прибора, подходя к нему по необходимости (рис.20).

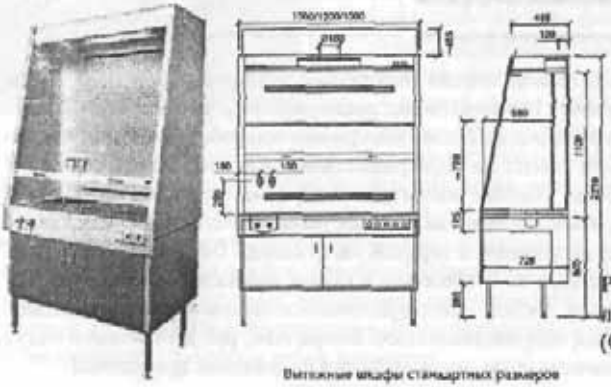


Рис. 15. Вытяжной лабораторный шкаф (ООО "БиоЛайн").

Вытяжные шкафы стандартных размеров

Рис. 16. Рабочее место для работы с культурами микроорганизмов с расположением рабочей зоны в герметичном боксе.

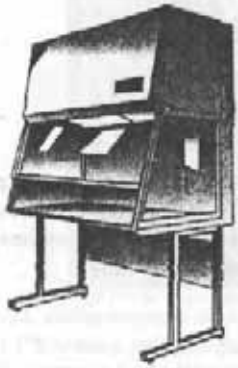


Рис. 17. Лабораторный ламинарный шкаф с вертикальным потоком воздуха (ООО "БиоЛайн").

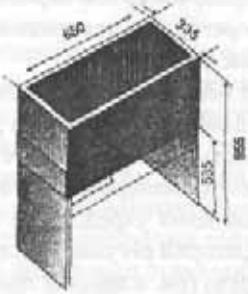


Рис. 18. Настольный бокс с вертикальным потоком воздуха для рабочего места для выполнения полимеразной цепной реакции (ООО "БиоЛайн").

Важную роль играет освещение рабочего места. Хорошее освещение повышает остроту зрения, способствует ускорению выполнения рабочих процессов и повышению качества работы, а недостаточная освещенность - приводит к перенапряжению зрения и быстрому утомлению, ухудшает результаты труда.

Рис. 19. Рабочее место для работы в положении сидя возле автоматического анализатора, размещенного на лабораторном столе.("Юнимед лабораториз", Москва).

Рис. 20. Рабочее место для работы в положении стоя возле автоматического анализатора "островкового типа".

Лабораторное рабочее место может освещаться естественным светом (в этом случае желательно располагать рабочие столы перпендикулярно к окнам) или общими для всего лабораторного помещения светильниками, расположенными на потолке (рис. 21).

В случае необходимости рабочее место может освещаться локальным светильником, однако при этом надо стремиться обеспечить равномерное освещение рабочей зоны. Освещенность на рабочем месте должна быть 500-600 люкс, а там, где осуществляются измерения - 750 люкс. При строительстве новых зданий для медицинских учреждений требования по освещенности в помещениях лабораторий регулируются строительными нормами и правилами охраны труда (см. в данном томе).

Проводя аналитическую работу, нужно иметь в виду повышенную чувствительность к действию света некоторых аналитов, что может требовать организовывать соответствующие рабочие места в условиях защиты проб биоматериалов от избыточного освещения.

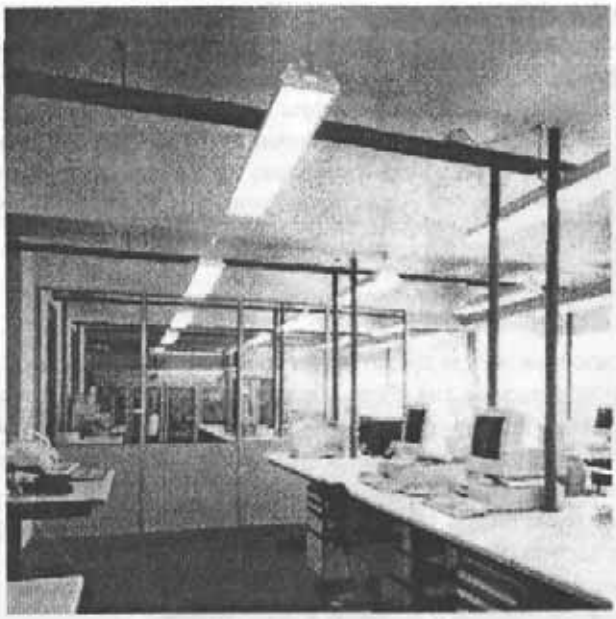


Рис.21. Лабораторное помещение с равномерным общим освещением рабочих мест ("Юнимед лабораториз", Москва).

II. Элементарные лабораторные процедуры и их оснащение

Процесс лабораторного анализа связан с некоторыми элементарными условиями, вытекающими из самой сущности этого процесса. Понятно, что в процессе лабораторного исследования анализируемый образец биоматериала должен быть отделен от других образцов. Из общего объема образца должны быть взяты строго определенные доли для участия в отдельных видах количественных исследований. Применяемые при анализе реагенты используются также в строго определенных дозах, что невозможно без точного отделения этих доз от остальной массы реагента. Процесс взаимодействия реагентов с образцом должен происходить изолированно от других образцов. Наиболее полное взаимодействие реагентов с образцом и его компонентами происходит в их жидком состоянии, т.е. в растворенном виде. Отсюда вытекает необходимость выполнения в каждой лаборатории некоторых элементарных процедур и использования для этих процедур соответствующих устройств, составляющих элементарное

лабораторное оборудование. К числу таких процедур относятся взвешивание навесок реагентов и приготовление растворов, а устройствами, обеспечивающими выполнение этих процедур, являются различные предметы лабораторной посуды, весы и дозаторы. Хотя эти устройства и предназначены для выполнения элементарных процедур, современный технический прогресс привел к созданию достаточно эффективных вариантов этого оборудования, способных существенно повысить точность и удобство лабораторной работы.

Лабораторная посуда.

Лабораторная посуда представляет собой емкости различной формы и объема, используемые для сбора образцов биоматериалов, для размещения аликвот (проб) биоматериалов и растворов реагентов, для проведения процедур пробоподготовки (термостатирование, центрифугирование), для проведения аналитических процедур. Существует обширная номенклатура этих изделий, выбор из которой необходимого лаборатории ассортимента определяется профилем выполняемых ею исследований:

- Бутыли, флаконы и виалы;
- Колбы конические и сферические узкогорлые;
- Пробирки многоцелевые;
- Пробирки вакуумные;
- Пробирки центрифужные и микроцентрифужные;
- Пипетки для перенесения жидкости и мерные;
- Микропипетки;
- Капилляры;
- Многолуночные и глубоколуночные планшеты;
- Предметные и покровные стекла;
- Кюветы для измерительных приборов.(рис. 22)

Широко распространенным предметом лабораторной посуды является пипетка, однако она скорее служит средством отмеривания растворов (см. ниже).

Лабораторная посуда может быть многоразового и одноразового использования. Одноразовая посуда (большей частью изготавливаемая из пластмассы)предоставляет значительные удобства при ее использовании и дает экономию времени, так как не нуждается в мытье. Ряд фирм на российском рынке предлагает пробирки, предназначенные для ускоренного взятия крови: Vacutainer с замком Hemogard (фирма "Cormay") , S-

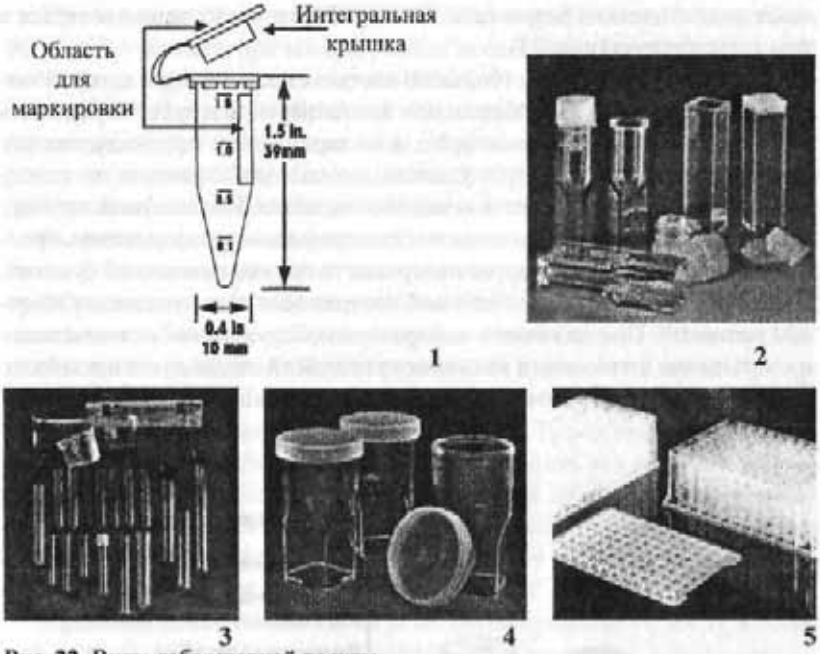


Рис. 22. Виды лабораторной посуды.
1 - схема микроцентрифужной пробирки; 2 - кюветы; 3 - многоцелевые пробирки; 4 - флаконы; 5 - планшеты («Финбио»).

Monovette для взятия венозной крови и Microvette для взятия капиллярной крови (фирма "Sarstedt"), Vacuette для венозной крови и MiniCollect для капиллярной крови(производитель " Greiner labortechnik", дистрибьютор "Медицинская компания ОМБ"). Эти пробирки закрыты резиновыми колпачками, воздух в них разрежен, что позволяет, использовав специальные двусторонние иглы, введя один конец иглы в вену, другим ее концом пройти резиновую мембрану. При этом разреженная атмосфера внутри пробирки побуждает кровь из вены быстро изливаться в пробирку, что значительно сокращает время пережатия вены жгутом и ограничивает отрицательные влияния этого пережатия на содержание ряда аналитов и, тем самым, на результаты лабораторного исследования. Некоторые устройства (например, S-Monovette) позволяют на выбор осуществлять как аспирационный, так и вакуумный способ взятия крови. Выпускаются также пробирки с консервантами, антикоагулянтами, разделительным гелем что, значительно облегчает работу персонала и улуч-

шает аналитические результаты. Эти пробирки могут использоваться в процессе анализа (рис. 23).

Многоразовую посуду (большей частью стеклянную), в которой выполняются анализы, - пробирки или контейнеры - следует надписывать только специальным фломастером, а не карандашом по стеклу, так как такие надписи потом трудно удалить, кроме того, карандаш по стеклу при нагревании расползается и надпись теряется. Надписывать пробирки или колбы можно и обычным мягким графитовым карандашом, предварительно обработав участок поверхности посуды наждачной бумагой. Надпись с образовавшейся матовой поверхности легко удаляется обычной резинкой. При наличии в лаборатории оборудования для печатания и считывания штрихового кода вместо надписей используют наклейки с кодом, соответствующим пробе определенного пациента или определенному реактиву.

Рис. 23. Вакуумные пробирки для взятия образцов венозной крови Vacuette ("Greiner").

При многоразовом использовании лабораторной посуды она должна быть чисто вымыта, причем для разных исследований требования к чистоте посуды и, следовательно, способы мытья неодинаковы. Наиболее широко распространена обработка стеклянной посуды хромовой смесью (хромпиком). Для ее приготовления в большую фарфоровую ступку насыпают кристаллы бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$) и растирают с концентрированной серной кислотой, постепенно увеличивая ее количество так, чтобы раствор был насыщенным. Смесь должна иметь красноватый оттенок и нагреваться, если ее налить в мокрую посуду. Когда хромпик приобретает зеленый цвет и перестает нагреваться, это будет означать, что его способность к окислению органических соединений исчерпана, в связи с чем он не может более применяться для мытья посуды. Хромовую смесь наливают в колбы, цилиндры и т.д. или погружают в нее более мелкие предметы - пипетки, флакончики и т.п. Перед тем как обрабатывать посуду хромпиком, нужно тщательно удалить все видимые на глаз загрязнения, в том числе надписи карандашом по стеклу. В противном случае хромовая смесь быстро портится, но, главное, при взаимодействии с органическим веществом могут образоваться ядовитые пары и выделяться тепло, что таит в себе опасность взрыва.

Хромовая смесь - очень едкий реактив: он прожигает одежду, а попадая на кожу, вызывает ожоги. Поэтому, если возможно, лучше пользоваться менее едкими средствами - содой, мылом, стиральным порошком. Если посуду моют, погружая ее в моющие растворы, то сначала нужно удалить грязь и надписи с внешней поверхности и вымыть ее теплой водой с мылом; если надписи сделаны стеклографом (карандашом по стеклу), их удаляют ватой, смоченной в органическом растворителе (хлороформ, эфир и т.п.). Грязь на внешней поверхности не только портит моющие растворы, но и может попасть с ними на внутреннюю поверхность посуды.

Каждый способ мытья посуды имеет свои преимущества и недостатки; он должен быть адекватен тому виду анализа, для выполнения которого посуда предназначается. Поэтому желательно всегда использовать один и тот же комплект посуды. Мытье хромпиком обеспечивает степень чистоты, достаточную практически для всех видов лабораторных клинических работ, но этот способ трудоемок и требует соблюдения мер предосторожности. Стиральные порошки безопаснее и работать с ними проще, но надо иметь в виду, что они прочно адсорбируются на стекле и могут быть удалены только при многократном промывании посуды во-

дой. Для каждого вида анализов нужно разработать адекватный - не слишком трудоемкий, но достаточно надежный метод мытья посуды, убедиться, что он не искажает результаты исследований и всегда пользоваться одним и тем же моющим средством. Однозначные советы дать трудно, так как поступающие в продажу стиральные порошки помимо основного детергента - алкилсульфоновых кислот - содержат различные добавки, а разные сорта стекла по-разному выщелачиваются и адсорбируют моющие средства.

Следует постоянно заботиться также о чистоте той посуды, которую не моют перед каждым анализом (пипетки и флаконы для реактивов). Иногда вновь приготовленную порцию реактива наливают во флакон, в котором еще сохранились остатки предыдущей порции этого же реактива, но, как правило, остатки выливают и флакон моют с хромпиком. Это приходится делать потому, что существует угроза развития грибов и микробов, для которых многие реактивы оказываются подходящей средой. Мытье флаконов с хромпиком и высушивание в горячем сушильном шкафу хотя и не обеспечивает полную стерильность, но значительно уменьшает микробную обсеменённость и способствует лучшей сохранности реактивов. То же относится и к пипеткам, которыми реактивы отмеривают.

В лабораториях, где приходится мыть много посуды, удобно пользоваться лабораторными посудомоечными машинами, в которых используется ультразвуковая очистка поверхностей. Если в загрязненной посуде был или мог быть инфицированный биологический материал, она перед тем, как закладываться в моечную машину, должна быть стерилизована согласно санитарным правилам работы с соответствующим материалом. Лабораторная посудомоечная машина имеет ванну с крышкой, обычно объемом 3-10 л, в которую заливают моечный раствор и кладут посуду, она обрабатывается ультразвуком при температуре до 60°С, после чего промывается чистой водой (рис. 24).

Рис. 24. Ультразвуковая моечная машина (ООО "БиоЛайн").

До пятидесятых годов вся лабораторная посуда готовилась только из стекла или фарфора, в редких случаях из металла. С тех пор стали широко использовать пластмассы - сначала полиэтилен, затем и другие, с самыми разными свойствами: из прозрачной (пропускающей свет вплоть до ультрафиолетовой области) готовят оптические кюветы, из поглощающей сине-фиолетовую часть спектра - посуду для чувствительных к свету реактивов. Из пластмассы изготовляются также контейнеры для проб биологического материала, пробирки, наконечники для пипеток, сосуды для выращивания культур и т.д. Преимущество пластмассы перед стеклом очевидны - она не бьется, легче, дешевле. Для каждого вида лабораторной работы удается подобрать соответствующий сорт пластмассы, которая допускает, например, температурную стерилизацию или задерживает свертывание крови. Планируя работу, надо ясно представлять себе свойства посуды, которая будет использоваться непосредственно в анализе и для хранения реактивов.

Образцы проб или реактивы соприкасаются только с внутренней поверхностью сосуда, поэтому в ряде случаев ее стенки делаются двуслойными: внутреннее покрытие обеспечивает химическую или биологическую инертность, внешний слой - механическую прочность. При мытье такой посуды надо соблюдать осторожность, чтобы не нарушить внутреннее покрытие, которое может быть также повреждено агрессивной жидкостью. В ряде случаев поврежденное внутреннее покрытие может быть восстановлено (рециклизовано). В таблицах 1 и 2 приведены свойства некоторых видов пластмасс, используемых в лабораторной работе. Надо иметь в виду, что химическое, техническое и коммерческое название одной и той же пластмассы могут различаться, соответствующую информацию надо искать в каталоге, либо в справочнике.

Лабораторная посуда нуждается в стерилизации - иногда перед работой и почти всегда после работы, поскольку всякий поступивший для исследования биологический материал должен рассматриваться как инфицированный. Большинство видов пластмасс выдерживает действие основных антисептиков: четвертичных аммониев, формалина, этанола, йода, окислителей, но длительное действие агрессивных веществ может сказаться на посуде из полиуретана, полистирола, поликарбоната и акрила.(*табл.2*)

Стерилизацию автоклавированием проводят обычно при 121°С и избыточном давлении в 1 атмосферу, при этом надо иметь в виду, что пластмассы плохо проводят тепло, поэтому большие объемы (свыше 1 л)

Таблица 1

Физическая устойчивость полимеров

Процесс	Полистирол	Полипропилен	Полиэтилен низкого давления	Полиэтилен высокого давления
Автоклавирование 121°С; 1,2 атм	нет	да	нет	нет
Химическая стерилизация	нет	да	да	да
Сухожаровая стерилизация 160°С	нет	нет	нет	нет
Радиационная стерилизация	да	да	да	да
Стерилизация окисью этилена	да	да	да	да
Хрупкость	0°С	-40°	-40°С	-40°С
Нарушение структуры	70°С	135°С	121°С	50°С
Прозрачность	отл	хор	хор	хор

надо очень долго выдерживать. Из этих соображений рекомендуют отдельно стерилизовать пластмассовые емкости (обязательно с открытой крышкой!) и отдельно сами растворы. Возможна также стерилизация сухим жаром. Температурной стерилизации не подлежат изделия из полистирена, поливинилхлорида, стиренакрилнитрила, полиэтилена и полиуретана.

Весы и взвешивание

В современных условиях в клинико-диагностических лабораториях гораздо реже, чем раньше, приходится пользоваться весами, поскольку большинство реактивов поступает в составе наборов заводского приготовления, содержащих необходимые для определенного исследования реагенты либо в жидкой форме готовыми к употреблению, либо уже отмеренными лиофилизированными порциями, которые остается только растворить в определенном объеме воды. Тем не менее периодически воз-

Таблица 2

Устойчивость некоторых пластмасс к воздействиям

Характер воздействия	Названия пластмасс											
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К	Л	М
Кислоты сильные или конц	5	5	5	3	3	4	3	5	2	5	5	5
Кислоты слабые и разведенные	5	5	5	5	5	5	2	5	5	5	5	5
Щелочи	5	5	5	3	3	5	2	5	5	5	5	5
Алифатические спирты	5	5	5	5	4	4	4	5	5	5	5	5
Альдегиды	4	4	4	3	2	2	?	4	?	3	5	4
Кетоны	4	4	4	3	3	3	5	?	3	3	5	2
Эфиры	4	4	4	3	3	3	?	4	?	4	5	4
Алифатические углеводороды	4	2	4	5	2	4	5	2	3	5	5	4
Ароматические углеводороды	4	2	2	3	3	3	5	2	3	3	5	4
Галоидсодержащие углеводороды	2	3	2	3	3	3	4	3	3	3	5	2
Сильные окислители	2	2	2	3	2	3	4	3	2	3	5	2
Температура сухой стерилизация	Н	Н	121°Н		121°	160°	Н	Н	Н	Н	170°	Н
Продолжительность сухой стерилизации	Н	Н	12ч	Н	12ч	120м	Н	Н	Н	Н	60м	Н
Стерилизация в автоклаве	Н	Н	121°Н		121°	121°	Н	Н	Н	Н	121°	Н

Обозначения:

А-полиэтилен высокой плотности; Б-полиэтилен низкой плотности;

В-полипропилен, полипропилен кополимер, полипропилен полиалломер;

Г-полипропилен тетрафталат кополимер; Д-поликарбонат; Е-полисульфонат; Ж-нейлон; З-полиметилпентен;И-полистирен; К-поливинилхлорид; Л-тефлон, тетрафлюороэтилен (TFE), фторированный этилен-пропилен (FFP), М-этилен-тетрафлюороэтилен (ETFE), перфлюороалюкси (FLPE).

5- устойчива, экспозиция 30 суток не вызывает разрушений, может выдержать годы,

4- пригодна, экспозиция 30 суток не вызывает разрушений, либо только незначительные повреждения,

3- не рекомендуется для постоянного использования, нарушение от потери цвета до потери прочности и механического разрушения может наступить немедленно,

2- опасно, может возникнуть пожар, разрушение окружающих предметов. травмы.

никает необходимость готовить навески реактивов или же калибровать посуду весовым методом.

Весы - старое измерительное устройство. К разработке их теории и совершенствованию приложили немало усилий такие выдающиеся умы, как Эйлер, Гаусс, Менделеев. В настоящее время существует большое количество различных вариантов и модификаций весов. В зависимости от назначения различают лабораторные весы общего назначения; весы образцовые, которые используются метрологами для калибровки и поверки обычных весов, и специальные весы, конструкция которых облегчает измерение каких-либо величин, которые не являются массой или весом, например, определение вместимости пипеток (дозаторов) с целью их калибровки.

Любые весы характеризуются двумя параметрами: наибольшим пределом взвешивания и ценой деления шкалы, которая принимается за основу при поверке весов, т.е. их чувствительностью. В зависимости от соотношения этих величин выделяют четыре класса лабораторных весов общего назначения. Самые точные весы относятся к первому классу, наименее точные - к четвертому. Лабораторные работники привыкли также различать более точные аналитические весы и более грубые технические весы.

По конструктивным особенностям различают равноплечные, двухпризменные и квадрантные весы. Равноплечные весы были разработаны раньше других, у них есть коромысло, которое состоит из двух равноплечных рычагов с опорной призмой посередине (рис. 25).

Груз и разновес размещаются на грузоподъемных площадках (чашках весов), которые подвешены на призмах, опирающихся на подушки. Двухпризменные (одноплощадочные) весы имеют более сложную конфигурацию (рис. 26).Их главный рычаг несимметричен, взвешивание производится с помощью встроенных гирь, оператору доступна только одна рабочая площадка, на которую помещается груз.

Квадрантные весы, как и одноплощадочные, имеют сложную схему рычагов (рис. 27).Их отличительная особенность та, что грузовая площадка (чашка) находится сверху, что заметно упрощает работу.

Шкалы весов бывают дискретные и аналоговые. В первом случае результат выдается в виде цифры, во втором - в виде показаний шкалы, между делениями которой возможна линейная интерполяция. Различают весы механические и электромеханические. В механических весах с жесткой подвеской измеряемая масса уравновешивается гирями ; при упругой подвеске вес компенсируется противодействием (сжатием, рас-

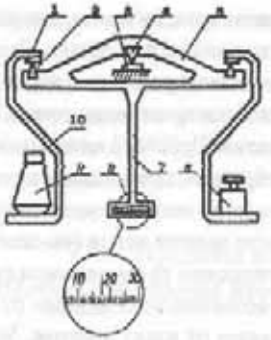


Рис. 25. Схема устройства равноплечных весов.

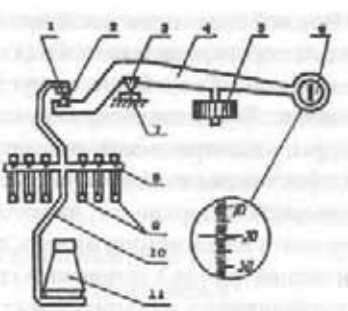


Рис. 26. Схема двухпризменных весов.

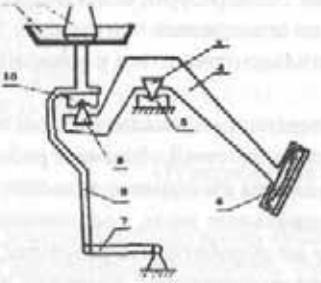


Рис. 27. Схема устройства квадрантных весов.

тяжением или закручиванием) пружины. В лабораториях чаще всего используются торзионные весы, в которых пружина закручивается вокруг собственной оси.

В электромеханических весах вес измеряемого груза компенсируется магнитным или электростатическим полем. Часто в качестве противовеса используется постоянный или электромагнит, который притягивается полем другого магнита.Величина электрического тока, который создает магнитное поле, способное удержать весы в положении равновесия, и служит оценкой величины измеряемой массы.Электромеханические весы бывают магнитоэлектрическими, электродинамическими, электростатическими, ферродинамическими и электромагнитными.

Если измеряемый с помощью гирь, пружины или электронного устройства вес компенсируется действиями оператора, то говорят о неавтоматических весах; в зависимости от степени автоматизации различают полуавтоматические и полностью автоматические весы.

Важной характеристикой весов служит время взвешивания, длительность которого определяется способом демпфирования, т.е. системой мер, уменьшающих колебания вокруг точки равновесия и ускоряющих ее достижение. В механических весах для этого используют воздушные цилиндры, в электрических - магнитные устройства. Другими важными характеристиками являются устойчивость к вибрации, требования к горизонтальной поверхности, на которой установлены весы, и зависимость результата взвешивания от того, на каком месте чашки весов (по центру или эксцентрично) установлен груз. Аналитические весы рекомендуется устанавливать на капитальных стенах, по возможности дальше от нагревательных и отопительных приборов, а также от шахт лифтов. Устанавливает , юстирует и периодически поверяет весы метрологическая служба, которая руководствуется ГОСТ 24104 - 88Е.

Взвешивая, нельзя забывать о влиянии температуры, особенно ее перепадов. Если изготовитель специально не оговаривает, что имеется температурная компенсация, следует внимательно относиться к возможности ошибки, вызванной этим фактором.

Современные электромеханические (электронные) аналитические весы обычно имеют встроенный микропроцессор, который облегчает работу - например, запоминает или печатает результаты взвешивания, вводит поправку на вес тары и т.д. (рис.28). Специальные весы, соединенные в линию с компьютером, позволяют сразу же обрабатывать результат, например, выполняют калибровку дозатора и составляют протокол о результатах.

Рис. 28. Общий вид электронных весов (Presisa XT 220A)

Приступая к эксплуатации весов, следует тщательно ознакомиться с инструкцией и строго выполнять все ее требования, которые могут значительно различаться в зависимости от типа весов и изготовителя.

Допустимая погрешность измерения массы регламентируется упомянутым выше ГОСТ, причем среднее квадратичное отклонение в серии взвешиваний не должно превышать 1/3 допустимого значения. (табл. 3).

Таблица 3

Пределы допустимого значения (± мг)

Наибольший предел взвешивания	Класс весов			
	1	2	3	4
до 200 мг	0,005	0,015	-	-
200 мг-1г	0,075	0,025	-	-
1 - 2 г	0,015	0,030	-	-
2-20 г	0,03	0,1	0,25	-
20-50 г	0,075	0,03	0,50	-
50-200 г	0,15	0,75	2,0	15
200-300 г	0,3	1,5	5	38

Отмеривание растворов. Дозаторы

Отмеривание растворов является одной из наиболее часто выполняемых лабораторных процедур. Время, затрачиваемое на эти процедуры, и влияние точности дозирования биожидкостей и растворов реагентов на окончательные результаты исследования заставляет уделять правилам и средствам выполнения этих процедур первостепенное внимание.

Простейшим измерительным устройством для отмеривания растворов служит стеклянная пипетка. Пипетки бывают двух типов: для перенесения фиксированного объема жидкости и мерные. Каждый из типов имеет по две разновидности. Пипетки для перенесения фиксированного объема жидкости подразделяются на волюметрические и названные по имени предложивших их исследователей пипетки Оствальда-Фолина (Ostwald-Folin). Они представляют собой цилиндрическое расширение из стекла, соединенное с обеих сторон с более узкими стеклянными трубками. Вокруг верхней части трубки нанесена круговая насечка, там же должен быть указан объем полезной части пипетки . Отверстие нижней части пипетки должно быть значительно уже трубки, чтобы чрезмерно быстрое или неполное вытекание жидкости не привело к ошибке , пре-

выпающей допустимое ее значение: 0,01 мл на 5 мл дозируемого объема. Обычные размеры волюметрических пипеток 1; 2; 3; 4; 5 и 10 мл. Чем меньше объем пипетки, тем ниже надежность дозирования. Эта разновидность пипеток предназначена для приготовления буферных и стандартных растворов, представляющих собой невязкие жидкости. Пипетки Оствальда-Фолина похожи на волюметрические, но расширение расположено ближе к нижнему концу пипетки для уменьшения поверхности контакта стенок пипетки с жидкостью, поскольку они предназначены для работы с вязкими жидкостями: кровью, сывороткой. Обычные размеры таких пипеток: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 мл. Круговая насечка расположена возле губного конца пипетки, что указывает на то, что это "выдувная" пипетка, то-есть такая, из которой необходимо полностью выводить весь объем набранной в нее жидкости.

Второй тип пипеток - мерные или градуированные - представляют собой стеклянные трубки, на стенки которых по всей их длине нанесены градуировочные деления. Этот тип пипеток также имеет две разновидности :пипетки типа Мора (Mohr) с градуировкой между двумя метками и серологические пипетки с градуировкой до нижнего конца (то-есть "выдувные"). Мерные пипетки обычно рассчитаны на 0,1; 0,2; 0,5; 5,0 и 10,0 мл. Они применяются для дозирования реактивов. Их средняя ошибка - до 0,04 мл на 5 мл дозируемой жидкости.

Микропипетки выпускаются объемом от 1 до 500 мкл.

При отмеривании растворов стеклянной пипеткой с делениями нижний мениск жидкости должен быть на уровне глаз работника и соответствующего деления пипетки, которую располагают строго вертикально. Вытекание жидкости из волюметрических пипеток должно быть непрерывным, конец пипетки должен быть прижат к внутренней стенке сосуда, куда переливается жидкость, не менее 2 сек. после прекращения потока жидкости. Из градуированных пипеток сток жидкости может быть приостановлен. При использовании серологической пипетки следует дать жидкости стечь, затем выдуть остаток.

Пипетку заполняют и опорожняют с помощью резиновой груши или шприца, соединенного с пипеткой резиновой трубкой (рис. 29). Недопустимо засасывать растворы ртом, так как при этом в рот могут попасть ядовитые жидкости. Слюна же почти неизбежно попадает в пипетку, из нее в реактивы и опытные пробы. После того, как пипетка заполнена с помощью резиновой груши, ее можно отсоединить, закрыть отверстие пипетки пальцем и осторожно выпускать раствор, но при соответствую-

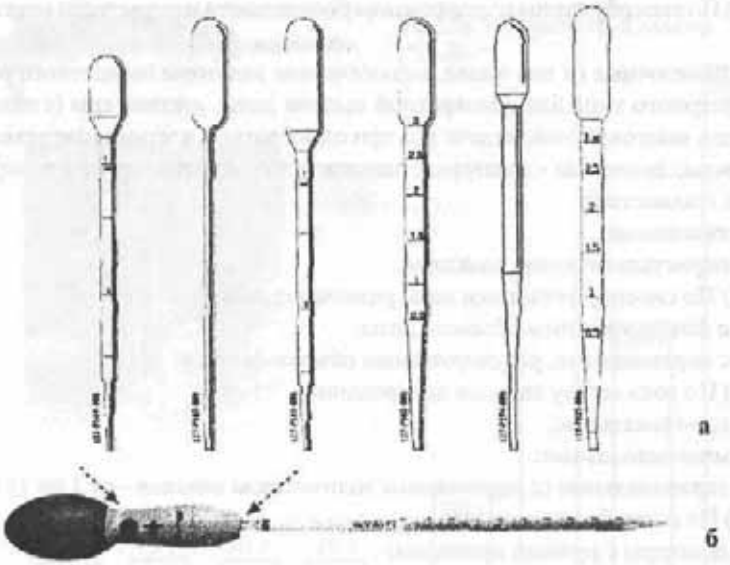


Рис. 29. Лабораторные пипетки («Финбио»). а. Различные виды пипеток. б. Механическая «груша» (взамен резиновой) для безопасного набора жидкости в пипетки. 1. Кнопка для сброса жидкости и продувки пипетки. 2. Силиконовый адаптер позволяет использовать «грушу» для работы с пипетками любого диаметра, объемом от 1 до 100 мл. Адаптер может подвергаться автоклавированию

щем навыке удобнее регулировать вытекающие из пипетки объемы жидкости, надавливая на грушу. Оправдывает себя и такая система, когда пипетка вертикально укреплена в штативе Бунзена, а с помощью другой лапки на том же штативе укреплены шприц или резиновая груша. Перемещая поршень шприца, можно заполнять пипетку и выпускать нужные порции реактива.

Для приготовления растворов реактивов известной концентрации используются волюметрические колбы объемом от 1 до 4000 мл, на стенки которых нанесены мерные штрихи.

В современных лабораториях для отмеривания растворов применяют разнообразные дозирующие устройства - дозаторы, которые также называют механическими и автоматическими пипетками, а также дилюторы и диспенсоры.. Их можно подразделить на несколько групп (В.Л.Войхонский и др., 1998):

а) По способу взятия и дозирования биожидкости или раствора реактива:

- пипеточные (в том числе, механические дозаторы поршневого или плунжерного типа для однократной выдачи дозы; диспенсеры (степперы) для многократной выдачи доз при однократном взятии дозируемого раствора; дилюторы - дозаторы с одновременным разбавлением дозируемых жидкостей);
- клапанные;
- перистальтические дозаторы.

б) По способу установки дозы различают дозаторы:

- с фиксированным объемом дозы;
- с переменными, регулируемыми объемами доз.

в) По количеству каналов дозирования:

- одноканальные;
- многоканальные;
- вариканальные (с переменным количеством каналов - от 1 до 12).

г) По способу управления:

- дозаторы с ручным приводом;
- с автоматическим приводом;
- с автоматическим приводом с микропроцессорным управлением.

д) Пипетки с позитивным перемещением.

е) Роботизированные разливочные станции.

ж) Специализированные дозирующие устройства автоанализаторов.

Дозатор - это устройство, с помощью которого отмеривают заданный объем пробы или реактива. Дилютор отмеривает одновременно две жидкости - обычно небольшой объем исследуемой пробы и значительно больший объем реактива, который эту пробу разводит.

В практике клинико-диагностических лабораторий чаще всего применяют *пипеточные одноканальные и многоканальные дозаторы*. В автоанализаторах дискретного типа поршневые клапанные дозаторы, диспенсеры и дилюторы используются как компоненты систем пробораспределения и подготовки реакционной смеси. Перистальтические насосы являются компонентами автоанализаторов проточного типа.

По способу сброса дозируемой жидкости можно выделить дозаторы с воздушным перемещением (air displasment) и с непосредственным выдавливанием (positive displasment). И в том, и в другом варианте отмеривание осуществляется перемещением поршня, но в первом случае он кон-

Рис. 30. Механический дозатор ("Biohit").

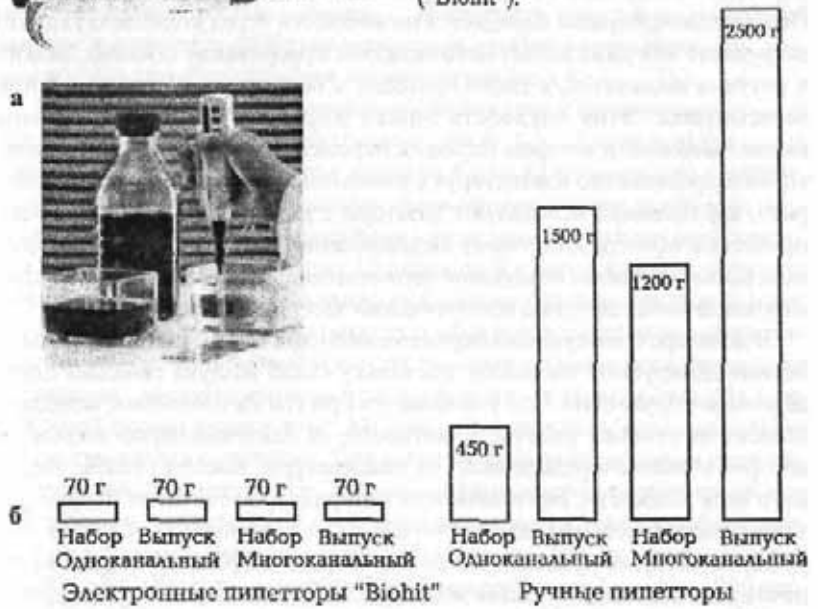


Рис.31. Дозирование жидкости с помощью электронного дозатора. а. Вид дозатора фирмы "Biohit". б. Эргономическое преимущество электронных дозаторов по сравнению с механическими. Цифры над столбиками диаграммы указывают величину мышечного усилия при работе с дозаторами соответствующего типа.

тактирует с жидкостью через столб воздуха (воздушную подушку), во втором непосредственно.

Дозатор с воздушным перемещением состоит из двух функциональных частей - поршня, который отмеривает нужный объем, и сменного одноразового наконечника, в который засасывается измеряемая жидкость. Поршень приводится в движение либо вручную, нажатием кнопки на его головке (механический дозатор, рис. 30), либо портативным электродвигателем с батарейкой (электронный полуавтоматический дозатор, рис. 31). Поршень соединен с наконечником воздушным каналом.

Дозатор с ручным приводом имеет три положения кнопки -"отпущено","нажато" и "нажато до упора", когда кнопка отпускается, поршень переходит в верхнее положение, засасывая в сменный наконечник дози-

руемый объем; нажимая на кнопку, выдавливают жидкость, после чего поршень можно еще немного переместить, чтобы удалить ее остатки. Перемещение поршня передается на жидкость через столб воздуха, что затрудняет или даже делает невозможным отмеривание тяжелых, вязких и летучих жидкостей, а также приводит к образованию аэрозолей при засасывании. Этих неудобств лишен дозатор с непосредственным выдавливанием, в котором поршень перемещается в самом наконечнике, непосредственно контактируя с измеряемой жидкостью. В лабораториях, как правило, используют дозаторы с воздушным перемещением, прибегая к непосредственному выдавливанию только если по приведенным выше причинам воздушное перемещение противопоказано, например, когда имеется угроза контаминации частицами аэрозоля.

В дозаторе с воздушным перемещением ход поршня на 2-4% больше объема дозируемой жидкости, поскольку столб воздуха обладает определенной упругостью. Это учитывается при его изготовлении, поправка зависит от условий работы, в частности, от давления паров жидкости, которое в свою очередь зависит от температуры, высоты столба, удельного веса жидкости, смачиваемости материала наконечника. Новые дозаторы калибруются на заводе для работы в определенных условиях, нарушение которых приводит к возникновению ошибок. Материал наконечника влияет на количество жидкости, остающееся после пипетирования, а также равномерность заполнения - отсутствие пены и пузырей - при засасывании. Точность отмеривания зависит также от скорости заполнения и опорожнения дозатора, поэтому электрический привод от батарейки обеспечивает лучшую воспроизводимость по сравнению с ручным. Очень важно, чтобы наконечник был плотно насажен, для этого его форма должна соответствовать дозатору, и следует избегать пользоваться «чужими» наконечниками, хотя, на первый взгляд, может показаться, что они не хуже, но такое впечатление может быть обманчивым. Погрешность дозирования при несоответствии наконечника посадочному конусу дозатора может достигать 10%.

На рынке имеется широкий ассортимент дозаторов и наконечников к ним, рассчитанных на различные условия работы - допускающие стерилизацию автоклавированием или облучением ультрафиолетовым светом; устойчивые к кислотам и растворителям; многоканальные устройства, по существу представляющие собой объединение в одном блоке нескольких дозаторов, имеющих общую управляющую головку и работающих синхронно. Дозаторы привлекательны для лабораторных работников

многими своими качествами: высокой точностью и стабильностью дозирования, широким диапазоном объемов доз; удобной разборной конструкцией; возможностью работать с пробирками и сосудами различной высоты и диаметра; удобным захватом и легким пипетированием; возможностью автоклавирования наконечников и т.д.

Механические и полуавтоматические пипетки и дозаторы могут быть одноканальными и многоканальными (на 4, 8 и 12 каналов) (рис. 32). Чаще всего в многоканальном дозаторе 8 или 12 каналов, что особенно удобно для использования в иммуно-ферментном анализе, где нужны многократные добавления и отсасывания реактивов и отмывающей жидкости. Так как плашки состоят из 12 рядов по 8 лунок в каждом, дозаторы имеют такое же количество каналов. Существуют разновидности дозирующих устройств, рассчитанные на особенности отдельных лабораторных процедур. При дозировании из бутылей применяются флаконные диспенсеры, насаживаемые на горловину флакона, бутыли (рис. 33). Специальной формы дозатор (рис. 34) предназначен для работы с длинными серологическими пипетками. Для работы с большими сериями проб или их разведений, в частности, для наполнения микропланшет на 96 или 384 позиции, применяются многоканальные дозировочные роботизированные установки, управляемые компьютерами. Так, например, система "Multiprobe" (Packard) рассчитана на одновременную загрузку 1000 пробирок или 32 микропланшетов, что позволяет обрабатывать от 300 до 1700 проб за 1 час (рис.35).

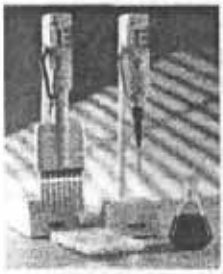


Рис. 32. Электронные дозаторы с различным числом каналов для дозирования ("Biohit").

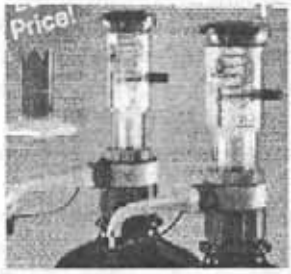


Рис. 33. Флаконные диспенсеры ("Brand").

Рис. 34. Электронный дозатор для работы с использованием серологических пипеток(" Biohit").

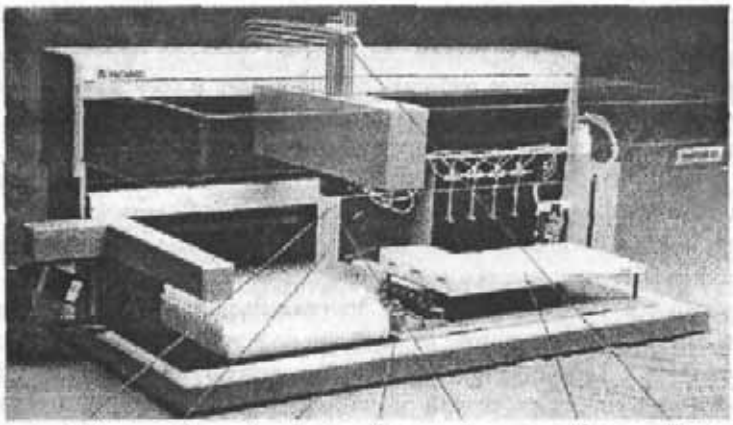


Рис. 35. Многоканальная роботизированная система для подготовки проб биожидкостей "Multiprobe" (Packard).
1 - дозаторы (от 4 до 8); 2 - фиксированные или сменные наконечники; 3 - станина, рассчитанная на 1000 пробирок или на 32 микропланшета; 4 - система, обеспечивающая гибкий переход от флаконов или пробирок к микропланшетам; 5 - система 8-канального всасывания и дозирования для работы с микропланшетами; 6 - детекция объемов проб до 50 мкл; 7 - точное соответствие внутреннего просвета трубок и длины протекания дозируемой жидкости минимизирует междозаторную вариацию.

Дозаторы с фиксированным объемом дозирования производятся с учетом потребности дозирования самых различных объемов доз (табл. 4).

Дозаторы переменного объема, с возможностью выбирать нужный объем дозирования в определенном диапазоне (например,0,5-10 мкл; 2-20 мкл; 100-1000 мкл; 1- 5 мл и т.д.) могут быть как одноканальными (табл. 5), так и многоканальными (табл. 6).

При работе с дозаторами можно применять различные режимы дозирования:

а) При прямом дозировании набранная в дозатор жидкость полностью сбрасывается. Таким образом удобно дозировать водные растворы с низкой концентрацией белка или детергентов. Для повышения точности дозирования рекомендуется предварительная промывка наконечника.

б) При обратном дозировании в наконечник набирают несколько больше дозируемого объема жидкости, что позволяет точно дозировать требуемый объем, так как остающаяся в наконечнике избыточная доля жид-

Таблица 4.

Технические характеристики одноканальных полуавтоматических дозаторов с фиксированными объемами доз *различных изготовителей*

Фирма – изготовитель, страна, дозатор	Объем дозы, мкл	Относительная основная погрешность,%	Воспроизводимость коэффициент вариации CV ,%
«Медлабортехника», Украина			
П - 0,02	20	4	4
П - 0,05	50	4	4
П - 0,1	*100*	3	3
П - 0,2	200	3	3
П - 0,5	500	3	3
Socorex, Швейцария	1 - 1000		
ACURA 811	1	<2,0	≤1,5
	5	<1,4	≤0,8
	10	<0,8	≤0,7
	25	<0,8	≤0,4
	100	<0,7	≤0,3
	1000	<0,6	≤0,2
Eppendorf, Германия	10	1,8	≤0,6
Unipette	20 - 25	1,0	≤0,3
	50	0,7	≤ 0,3
	100 - 1000	0,6	≤0,2
Eppendorf, Reference,	1	2,5	≤1,8
Германия	2	2,0	≤1,2
Eppendorf	5	1,5	≤0,8
	10	1,0	≤0,5
	20/25	0,8	≤0,3
	50	0,7	≤0,3
	100 - 2500	0,6	≤0,2
Gilson, Великобритания			
F2	2	5,0	≤1,5
F5	5	2,0	≤0,8
F10	10	1,0	≤0,5
F20	20	1,0	≤0,3
F25	25	1,0	≤0,3
F50	50	0,8	≤0,3
F100	100	0,8	≤0,25
F200	200	0,8	≤0,15
F250	250	1,5	≤0,3
F300	300	1,4	≤0,25
F400	400	1,2	≤0,2
F500	500	0,8	≤0,2
F1000	1000	0,8	≤0,13

Фирма – изготовитель, страна, дозатор	Объем дозы, мкл	Относительная основная погрешность,%	Воспроизводимость коэффициент вариации CV ,%
ThermoLabsystems,	5	1,4	1,4
Финляндия	10	0,9	0,8
Finnpipette Color	20	0,6	0,5
Термо Лабсистеме, Россия	25	0,6	0,5
Леннпипет Колор	50	0,6	0,4
	100	0,4	0,3
	200	0,4	0,3
	250	0,4	0,3
	500	0,3	0,3
	1000	0,3	0,3
ThermoLabsystems,	1 микро	4	4
Финляндия	2 микро	2,5	2,0
Finnpipette Digital	5 микро	1,4	1,4
Термо Лабсистеме, Россия	10 микро	0,9	0,8
Леннпипет Дигитал	20	0,6	0,5
	25	0,6	0,5
	50	0,6	0,4
	100	0,4	0,3
	200	0,4	0,3
	250	0,4	0,3
	500	0,3	0,3
	1000	0,3	0,3
	2000	0,3	0,2
	3000	0,3	0,2
	5000	0,3	0,2
	10000	0,3	0,2
BIOHIT, Финляндия	5	<3,5	<3,0
BIOHIT	10	<1,5	<3,0
PROLINE	20	<1,8	<1,0
	25	<1,5	<0,5
	50	<1,0	<0,4
	100	<0,8	<0,3
	200	<0,7	<0,2
	250	<0,8	<0,3
	500	<0,7	<0,3
	1000	<0,6	<0,2
	2000	<0,9	<0.3
	5000	<0,8	<0.2

Таблица 5.

Технические характеристики одноканальных полуавтоматических дозаторов с переменными объемами доз различных изготовителей.

Фирма, страна, наименование дозатора	Объем дозы, мкл	Относительная основная погрешность, ±%	Воспроизводимость, коэффициент вариации, CV %
Socorex	5 - 50		
Швейцария	5	<1,5	<1,0
ACURA 821	50	<1,0	<0,5
	50 - 200		
	50	<1,0	<0,5
	200	<1,0	<0,5
	200 - 1000		
	200	<1,0	<0,6
	1000	<1,0	< 0,5
" Micro"	0,2 - 2		
Calibra 822	0,5	<6	<5
	2	<2	<1,5
	1 - 10		
	1	<2,0	<2,0
	10	<1,0	<0,5
	2 - 20		
	2	<2,0	<1,7
	20	<1,0	<0,5
	10 - 100		
	10	<1,0	<1,0
	100	<0,8	<0,2
	20 - 200		
	20	<1,0	<0,6
	200	<0,8	<0,2
	100 - 1000		
	100	<0,7	<0,5
	1000	<0,5	<0,2
«Macro»	200 - 2000		
Calibra 832	200	<0,8	<0,5
	2000	<0,5	<0,2
	1000 - 10000		
	1000	<0,8	<0,3
	10000	<0,5	<0,15
ACURA 831	500 - 5000		
	500	<1,0	≤0,6
	5000	<1,0	≤0,4

Фирма, страна, наименование дозатора	Объем дозы, мкл	Относительная основная погрешность, ±%	Воспроизводимость, коэффициент вариации, CV %
Eppendorf	0,1 - 2,5		
Германия,	0,2	12	≤6
Eppendorf	1,0	2,5	≤1,5
Research	2,5	1,4	≤0,7
	0,5 - 10		
	0,5	5	≤2,8
	1	2,5	≤1,5
	10	1,0	≤0,4
	20 - 20		
	2	5	≤1,5
	20	1,0	≤0,3
	10 - 100		
	10	3,0	≤1,0
	100	0,8	≤0,2
	20 - 200		
	20	2,5	≤0,7
	200	0,6	≤0,2
	100 - 1000		
	100	3,0	≤0,6
	1000	0,6	≤0,2
	500 - 5000		
	500	2,4	≤0,6
	5000	0,6	≤0,15
Biomaster/Mastertip	1 - 20		
(для молекулярно -	2	6	≤4,0
биологических ис -	3	5,0	≤3,0
следований) 4830	5	4,0	≤2,0
	10	3,0	≤1,5
	20	2,5	≤0,8
Response 4850	0,5 - 20		
(электронные пипетки)	2	5,0	≤3,5/4,0 *
	20	1,0	≤0,5
	5 - 100		
	10	2,0	≤1,0/2,5*
	100	0,6	≤0,2
	20 - 500		
	50	1,5	≤1,0
	500	0,5	≤0,2
	50 - 1000		
	100	1,5	≤1,0
	1000	0,5	≤0,2
	200 - 5000		
	500	1,5	≤0,5
	5000	0,6	≤0,2
			*зависит от способа пипетирования

Фирма, страна, наименование дозатора	Объем дозы, мкл	Относительная основная погрешность, ±%	Воспроизводимость, коэффициент вариации, CV %
Gilson, Великобритания Ultramicro pipettes Pipetman (для молекулярно - биологических исследований)			
P2	0,1 - 2	12	≤6
	0,2	5	≤2,5
	0,5	1,5	≤0,7
	2		
P10	0,5 - 10		
	1	2,5	≤1,25
	5	1,5	≤0,6
	10	1,0	≤0,4
Micropipettes Pipetman			
P 20 (2 – 20 мкл)	2	5,0	≤1,5
	5	2,0	≤0,8
	10	1,0	≤0,5
	20	1,0	≤0,3
P 100 (20 – 100 мкл)	20	1,8	≤0,5
	50	0,8	≤0,24
	100	0,8	≤0,15
P 200 (50 – 200 мкл)	50	1,0	≤0,4
	100	0,8	≤0,25
	200	0,6	≤0,15
Thermo Labsystems, Финляндия Finnpipette Color Термо Лабсистемс, Россия Леннипет Колор	0,5-10	3,5-1,0	3,0-0,8
	5-50	3,0-0,6	2,5-0,3
	20-200	3,0-0,6	1,5-0,2
	100-1000	1,5-0,5	0,6-0,2
	1000-5000	1,5-0,5	0,5-0,2
Thermo Labsystems, Финляндия Finnpipette Digital Термо Лабсистемс, Россия Леннипет Дигитал	0,2-2,0 микро	12,0-2,5	10,0-2,0
	0,5-10 микро	2,5-1,0	2,0-0,5
	0,5-10	3,5-1,0	3,0-0,8
	2-20	3,0-1,0	1,5-0,4
	5-50	3,0-0,6	2,5-0,3
	10-100	3,0-0,8	1,0-0,2
	20-200	1,8-0,6	0,7-0,2
	200-1000	0,9-0,6	0,3-0,2
	100-1000	1,0-0,6	0,6-0,2
	1000-5000	0,8-0,5	0,3-0,2
	2000-10000	1,0-0,5	0,3-0,2

Фирма, страна, наименование дозатора	Объем дозы, мкл	Относительная основная погрешность, ±%	Воспроизводимость, коэффициент вариации, CV %
Thermo Labsystems, Финляндия Finnpipette BioControl SingleChannel modules	5 - 40	2,5 - 0,5	2,0 - 0,3
	40 - 200	1,1 - 0,6	0,8 - 0,3
	200 - 1000	0,9 - 0,6	0,6 - 0,2
	1000 - 5000	1,0 - 0,5	0,4 - 0,2
	2000 - 10 000	1,0 - 0,5	0,3 - 0,2
Thermo Labsystems, Финляндия Finnpipette PDP (для ПЦР и других методов амплификации ДНК)	0,5 - 25		
	0,5	зависит от пользователя	зависит от пользователя
	5	5,0	2,5
	25	2,5	1,0
	20 - 200		
	20	зависит от пользователя	зависит от пользователя
	50	4,0	0,5
	200	1,5	0,2
Thermo Labsystems, Финляндия Finnpipette Stepper Термо Лабсистемс, Россия Леннипет Степпер	10 - 5000		
	500/10 – 50**	1,0	1,0 - 0,6
	1250/25 - 125	0,8	0,8 - 0,5
	2500/50 - 250	0,8	0,7 - 0,3
	5000/100 - 500	0,8	0,5 - 0,2
	12500/250 - 1250	0,6	0,4 - 0,2
	25000/500 - 2500	0,5	0,5 - 0,3
	50000/1000 – 5000	0,5	0,5 - 0,3
	** другой отбираемый объем / дозируемый объем		
BIOHIT, Финляндия BIOHIT PROLINE – 1 - канальные с изменяемым объемом	0,5 – 10	< 5,0 - <1,5	<5,0 - <1,0
	5 - 50	<3,5 - <1,2	<4,0 - <0,4
	50 - 200	<1,0 - <0,7	<0,2 - 0,4
	200 - 1000	<0,8 - <0,8	<0,2 - <0,3
	1000 - 5000	<1,0 - <0,8	<0,2 - <0,3
BIOHIT PROLINE – 1 - канальные электронные микродозаторы	0,2 - 10		
	10	<2,5	<1,5
	5 - 100		
	100	<0,6	<0,2
	10 - 250		
	250	<0,6	<0,2
	20 - 500		
	500	<0,5	<0,2
	50 - 1000		
	1000	< 0,5	<0,2
	100 - 5000		
	5000	<0,7	<0,3

Таблица 6.

Технические характеристики многоканальных полуавтоматических пипеток с переменными объемами различных изготовителей (сменные наконечники из полипропилена).

Фирма - изготовитель, страна, название дозатора	Кол-во, каналов	Объемы доз, мкл.	Шаг мкл.	Основная относительная погрешность, ± % (для дозы, мкл)	Воспроизводимость CV,%
Thermo Labsystems,	4	5-50	0.5	5.0-1.5	2.0-0.7
Финляндия	8	5-50	0.5	5.0-1.5	2.0-0.7
Finnpipette Color MCP	12	5-50	0.5	5.0-1.5	2.0-0.7
Термо Лабсистемс,	4	50-300	5.0	4.6-1.0	1.5-0.3
Россия	8	50-300	5.0	4.6-1.0	1.5-0.3
Леннпипет Колор	12	50-300	5.0	4.6-1.0	1.5-0.3
Thermo Labsystems,	8	0.5-10	0,1	12.0-2.4	8.0-1.6
Финляндия	12	0.5-10	0.1	12.0-2.4	8.0-1.6
Finnpipette Digital MCP	8	5-50	0.5	5.0-1.5	2.0-0.7
Термо Лабсистемс,	12	5-50	0.5	5.0-1.5	2.0-0.7
Россия	16	5-50	0.5	5.0-1.5	2.0-0.7
Леннпипет Дигитал	8	50-300	5	4.6-1.0	1.5-0.3
	12	50-300	5	4.6-1.0	1.5-0.3
Finnpipette Varichannel	12	5 - 50	0,5	5,0 - 1,5	2,5 - 0,8
	12	40 - 200	1,0	4,5 - 1,0	1,5 - 0,4
	10	200 - 1000	5,0	3,0 - 1,2	2,5 - 0,6
Finnpipette BioControl	8	0.5-10	0.1	12.0-2.4	8.0-1.6
MultiChannel modules	8	5-50	1.0	5.0-1.5	2.0-0.7
	12	5-50	1.0	5.0-1.5	2.0-0.7
	16	5-50	0.5	5.0-1.5	2.0-0.7
	8	50-300	1.0	4.6-1.0	1.5-0.3
	12	50-300	1.0	4.6-1.0	1.5-0.3
	8	150-1500	1.0	4.0-0.7	2.5-0.3
Finnpipette Multistepper	8	50-250	50	4.0-2.0	4.0-2.0

Фирма - изготовитель, страна, название дозатора	Кол-во, каналов	Объемы доз, мкл.	Шаг мкл.	Основная относительная погрешность, ± % (для дозы, мкл)	Воспроизводимость CV,%
Socorex, Швейцария «Multi» Calibra	8	10 - 100	0,5	<1,0 - <0,7	<1,0 - <0,4
	8	20 - 200	1,0	<0,9 - <0,7	<0,6 - <0,3
	12	10 - 100	0,5	<1,0 - <0,7	<1,0 - <0,4
	12	20 - 200	1,0	<0,9 - <0,7	<0,6 - <0,3
BIOHIT, Финляндия BIOHIT, PROLINE с изменяемым объемом	4	5 - 50	0,5	<1,5	<0,5
	4	50 - 250	5,0	<1,0	<0,3
	8	0,5 - 10	0,1	<1,5	<1,0
	8	5 - 50	0,5	<1,5	<0,5
	8	50 - 250	5,0	<1,0	<0,3
	8	50 - 300	5,0	<0,8	<0,25
	12	5 - 50	0,5	<1,5	<0,5
	12	50 - 250	5,0	<1,0	<0,3
	12	50 - 300	5,0	<0,8	<0,25
электронные микродозаторы	8	0,2 - 10	0,1	<1,5(10)	<1,0(10)
	8	5,0 - 100	1,0	<0,8 (100)	<0,3(100)
	8	25 - 250	5,0	<0,7(250)	<0,2(250)
	8	50 - 1200	10,0	<0,8(1000)	<0,2(1000)
	12	5 - 100	1,0	<0,8(100)	<0,3(100)
	12	25 - 250	5,0	<0,7(250)	<2(250)
Eppendorf, Германия Titerman	8	0,5 - 10	0,1	8,0(1) - 2,0(10)	<5,0(1)-<1,0(10)
	8	30 - 300		1,5(50) – 0,6(300)	≤0,8(50) - ≤0,2(300)
	8	5,0 - 50	0,5	4,0(5) - 0,8(30)	<2,0(5)-<0,4(30)
Электронные Пипетки					
Response 4850	8(12)	5,0 - 100	1,0	2(10) - 0,8(100)	<2,0(10)- ≤0,25(100)
	8(12)	20 - 200	5,0	2,0(20) - 0,7(200)	≤1,0(20)- ≤0,2(200)
	8	50 - 1200		0,6(100) – 1,2(1200)	≤0,9(100)- ≤0,3(1200)
Gilson, Англия Multichannel Pipetman	8	20 - 200	10,0	2,5(20) - 1,0(200)	<1,25 (20)-<0,5(200)

кости нивелирует погрешность, которая могла бы возникнуть из-за образования пены или мениска. Рекомендуется для работы с пенящимися и вязкими жидкостями, включая биожидкости, а также для дозирования микрообъемов.

в) Многократное дозирование может осуществляться путем набора суммарного объема жидкости и последующего дозирования равных или различных объемов жидкости в той последовательности, которая может быть задана программой. Применение этих режимов дозирования значительно облегчает работу при приготовлении серийных разведений в различных видах современных методов исследования.

г) Многократная аспирация равных объемов жидкости применяется для отсасывания жидкости из микропланшетов при их промывке. Весь объем набранной в дозатор жидкости затем сбрасывается.

д) При работе в режиме разведения жидкость набирается в наконечник дозатора в три этапа: 1. набор растворяемого реагента; 2. создание воздушной "подушки" нажатием на кнопку "старт"; 3. набор растворителя. После выполнения этих трех процедур образовавшийся в дозаторе готовый раствор может быть дозирован.

Крупные фирмы ("Эппендорф", Германия; "Биохит", Финляндия) выпускают изделия, полностью подготовленные к работе, которые практически не требуют ухода, однако, необходимо соблюдать правила их использования. При этом надо иметь в виду следующее:

- гидростатическое давление: наконечник должен быть опущен на 1-2 мм ниже мениска, дозатор должен быть в вертикальном положении,

- смачивание внутренней поверхности наконечника: желательно перед отмериванием два-три раза засосать жидкость в наконечник и выпустить ее обратно,

- динамику течения жидкости: форма и материал наконечника подбираются так, чтобы истечение жидкости было наиболее полным, выпускать ее нужно, касаясь кончиком наконечника стенки сосуда, по которой жидкость стекает, не образуя капли.

Чтобы проверить герметичность поршня и наконечника дозатора, поступают следующим образом: наконечник соединяют с тонким шлангом, в который движением поршня засасывают окрашенную жидкость. Отмечают место, до которого она дошла, и повторяют засасывание несколько раз. Если поршень герметичен, жидкость будет перемещаться всегда до одного и того же места.

При дозировании в наконечнике образуется аэрозоль, который может приводить к загрязнению дозатора. Исследования, проведенные компанией "Biohit" , показали, что контаминация посадочного конуса дозатора происходит после 50-100 циклов дозирования, околопоршневое пространство контаминируется после 10-150 циклов дозирования, а после 500 циклов дозирования возможна обратная контаминация дозируемой жидкости.

Для предотвращения контаминации исследуемых образцов и дозатора применяются сменные защитные фильтры: а) полиэтиленовые стандартные фильтры, используемые в повседневной работе и предназначенные для защиты от аэрозольной контаминации; б) изолирующие фильтры, защищающие от бактериального загрязнения и от заброса жидкости внутрь посадочного конуса дозатора.

Если дозируемая жидкость по ошибке засосалась в поршень, ни в коем случае нельзя давать ей самостоятельно высыхать - надо разобрать дозатор, вынуть поршень из цилиндра, промыть его спиртом, высушить, смазать силиконовой смазкой и снова собрать. Может случиться, что отмериваемая жидкость, испаряясь в наконечнике, конденсируется на стенках поршневого цилиндра, затрудняя его ход. В этом случае нужно также разобрать дозатор, промыть его, высушить и смазать.

Согласно правилам международной организации по стандартизации (ISO 9000, EN 45000) дозаторы относятся к измерительным устройствам, качество которых проверяется два раза в год опытным персоналом путем калибровки на специальных стендах весовым методом, но их можно калибровать и в лаборатории, используя обычные аналитические весы: для дозаторов объемом до 50 мкл взвешивание должно выполняться с точностью до 0.01 мг, при большем объеме - с точностью 0.1 мг, температура помещения, в котором проводится работа, должна измеряться с точностью 0.1°С и поддерживаться с точностью 0.5°С в пределах 20-25°С. Чтобы избежать ошибки, вызванной потерей воды вследствие ее испарения, пространство внутри наружного кожуха весов насыщают водяными парами, помещая туда листы влажной бумаги.

Дозаторы объемом меньше 10 мкл калибруют, отбирая в сухой наконечник воду из взвешенного сосуда, который затем повторно взвешивают. Во время засасывания дозатор должен быть в вертикальном положении, а наконечник погружен в воду на 2-3 мм. Для больших объемов поступают наоборот: наконечник погружают на 2-3 мм в сосуд с водой, смачивают его несколько раз, набирая и выпуская воду, забирают нужный объем и пере-

носят его во взвешенный сосуд. Для этого касаются кончиком наконечника сухой стенки, нажимая на головку, выпускают жидкость, примерно через секунду нажимают «до упора» и дают стечь жидкости.

Объем пипетки определяют, разделив вес воды на ее плотность, которая при температуре 16-21°С составляет 0.998 мг/мкл, а при температуре 22-25°С 0.997 мкг/мл. Микропипетки калибруют по ртути, взвешивая отмеренный пипеткой ее объем и деля его вес на значение ее плотности, которое при температуре 25 ±5°С составляет 13,5340±0,0123 (±0,091%). Другой способ калибровки микропипеток основан на спектрофотометрическом определении р-нитрофенола в пробах, приготовленных с использованием микропипетки.В качестве референтного раствора используются три одинаковых раствора этого соединения, приготовленного путем добавления тремя различными волюметрическими пипетками по 1,0 мл раствора 105 мг/100 мл в волюметрические колбы объемом 250 мл , наполненные раствором NaOH концентрации 0,01 моль/л. Среднее из полученных при исследовании проб из этих трех растворов принимается за референтное значение A_1. Опытные пробы готовятся путем добавления по10 мкл раствора р-нитрофенола с помощью калибруемой микропипетки в 5 пробирок, содержащих точно отмеренные калиброванной пипеткой или диспенсером по 2,5 мл раствора NaOH концентрации 0,01 моль/л. Среднее значение 5 определений р-нитрофенола в опытных пробах принимается за значение опыта A_2. Расчет объема , дозированного тестируемой микропипеткой, производят по формуле $A_2 / A_1 \times D \times V$, где D это разведение опытного раствора, а V - это конечный объем в микролитрах разведенного опытного раствора. Из разницы между номинальным объемом тестируемой микропипетки и тем, который на самом деле был дозирован ею, рассчитывают ошибку дозирования. Она должна быть сравнена с величиной ошибки, указанной производителем, и с той, которая допустима в исследованиях, при проведении которых используется эта микропипетка.

III. НАЛАЖИВАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор,налаживание и освоение метода исследования - один из самых ответственных этапов лабораторной работы. Хотя общие принципы этого этапа являются одними и теми же во всех разделах лабораторной медицины, однако каждый раздел имеет свою специфику. Выбор метода определяется его свойствами и их соответствием клиническим задачам данного

лечебного учреждения и материально-техническим возможностям лаборатории. Следует, где только это возможно, использовать унифицированные или стандартизованные методы, свойства которых апробированы в квалифицированных (экспертных) лабораториях, и протоколы выполнения которых четко прописаны. При внесении тех или иных модификаций с учетом имеющегося оборудования и опыта сотрудников лаборатории эти отклонения от стандартного протокола должны быть подробно документированы и отражены в "Руководстве по качеству клинических лабораторных исследований" данной лаборатории, а точность результатов исследований должна соответствовать установленным нормам (см, раздел "Управление качеством клинических лабораторных исследований"). Детали налаживания метода исследования во многом зависят от того, идет речь о ручной или автоматизированной работе, используются готовые наборы реактивов или они должны готовиться непосредственно в лаборатории.

На рабочем месте следует иметь протокол методики, оформленный так, что каждая новая процедура начинается с новой строки, а сами процедуры пронумерованы по порядку их выполнения. Полезно в описании методики привести прописи всех используемых в процессе анализа реактивов с указанием квалификации их чистоты.

Удобнее и проще всего налаживать методику при наличии готового набора реактивов нужного качества заводского изготовления; в лаборатории остается только приготовить растворы согласно заводской инструкции. Если таких наборов в распоряжении лаборатории нет или они недоступны лаборатории из-за своей цены, приходится использовать реактивы, полученные из разных источников. При этом может быть неизвестно, соответствуют ли эти реактивы по своему качеству требованиям налаживаемого метода. В этом случае может оказаться необходимой проверка качества реактивов, а иногда очистка или даже синтез простейших соединений.

Теоретически совершенно чистых реактивов не существует, в каждом препарате есть какое-то количество примесей. Практически важно только, чтобы они не препятствовали данному анализу. В связи с тем, что разные партии реактивов могут содержать различные примеси, не всегда оговоренные в стандарте на данный реактив, может оказаться, что одна партия для конкретного вида исследования пригодна, а другая непригодна, хотя обе имеют одинаковую квалификацию. Поэтому каждая новая партия реактивов должна подвергаться проверке на пригодность.

Приготовление реактива начинается со взвешивания. Надо готовить такое его количество, которое может быть израсходовано за месяц (са-

мое большое - за 2 мес.), но в то же время навеска не должна быть менее 20-30 мг, так как иначе точное взвешивание весьма осложняется. При приготовлении калибровочных растворов в прописях обычно указывают круглые числа, например, 100 мг или 0,2 ммоля, которые должны быть растворены в 50 или 100 мл растворителя. Если реактив дефицитен или навеска мала, удобнее точно взвесить то количество реактива, которое сразу же попало на весы: допустим,вместо 10 мг взять 9,3 мг и растворить их в меньшем количестве воды (в данном случае не в 100 мл, а в 93 мл). Растворы обычно отмеривают с помощью мерной посуды - мерных колб и цилиндров, но иногда бывает удобно взвесить растворитель на весах, особенно если нужно отмерить большие и некруглые количества (например, 1450 мл). Это часто оказывается точнее, чем отмеривание нескольких объемов; не надо только забывать, что относительная плотность многих растворов отлична от 1.

Часто в прописях используют понятие " процентный раствор"; оно не совсем точно. Строго говоря, процент - это одна сотая часть среди качественно одинаковых частей. Поэтому когда говорят о 3% растворе, формально следует понимать такой раствор, в 100 г которого содержится 3 г данного вещества и 97 г каких-то других составных частей. Однако в химической литературе иногда неправильно называют процентным такой раствор, в 100 мл которого содержится 3 г данного вещества. Молярные растворы действительно готовят так, чтобы 1 л содержал столько-то молей растворенного вещества; этот принцип неправильно распространяют и на процентные растворы.

Иногда используют понятие " объемные проценты" , которое предполагает, что данный раствор получен путем смешивания А объемов растворенного вещества и 100 - А объемов растворителя. В связи с тем, что при смешивании жидкостей суммарный объем смеси обычно меняется, такой способ выражения нельзя считать удачным. Правильнее обозначать соотношение частей знаком "двоеточие " (:). Так, запись " вода: спирт: ацетон 1: 2: 2 " означает, что данная смесь получена путем смешивания 1 объема воды, 2 объемов спирта и 3 объемов ацетона.

Растворы с точными концентрациями, особенно калибровочные и буферные, следует готовить в мерных колбах; мерные цилиндры можно использовать только при отсутствии высоких требований к точности. Некоторые работники, пытаясь сэкономить время, при приготовлении раствора насыпают навеску непосредственно в мерную колбу, растворяют ее там и доводят объем до метки. Так можно поступать лишь в исключи-

тельных случаях, так как мерная посуда значительно дороже немерной, а когда насыпают вещество через узкое горлышко, а затем перемешивают и нагревают для растворения, колбу легко разбить.

Навеску растворяют в широкогорлой колбе или в химическом стакане в количестве растворителя, которое составляет от 30 до 80 % окончательного объема, а затем переливают в мерную колбу, споласкивают посуду, в которой готовили раствор, новой порцией растворителя, добавляют его в мерную колбу, а затем уже доводят до метки.

PH и буферные растворы

Все химические реакции, с которыми приходится сталкиваться специалисту клинической лабораторной диагностики, проходят в водных средах, а молекула воды диссоциирует с образованием ионов водорода и гидроксила:

$$H_2O = H^+ + OH^-$$

которые всегда присутствуют в водных растворах, влияя почти на все химические реакции, соответственно, сказываясь на результатах аналитических процедур. Неправильная концентрация водородных ионов - самая распространенная причина, по которой методика «не идет».

По закону действующих масс, концентрации недиссоциированных молекул воды, ионов водорода и гидроксила находятся в равновесии, которое описывается формулой:

$$\frac{[H] \times [OH]}{[H_2O]} = K(H_2O)$$

Величина константы зависит от температуры, с увеличением которой она также возрастает. При комнатной температуре (20 °С) произведение концентраций водородных и гидроксильных ионов составляет $0{,}86 \cdot 10^{-14}$, при 37°С возрастает до $3{,}13 \cdot 10^{-14}$. Так как общая концентрация воды в растворах высока - около 55 моль/л и постоянна, увеличение температуры приводит к тому, что возрастают концентрации как водородных, так и гидроксильных ионов.

Если в растворе больше водородных ионов, чем гидроксильных, такой раствор называется кислым; если больше гидроксильных ионов, его называют щелочным; если концентрации обоих ионов одинакового порядка - раствор нейтрален. Концентрации водородных и гидроксильных ионов в водных растворах прочно связаны приведенной выше формулой, поэтому достаточно указать одну из них, и, в данных условиях, вто-

рая величина будет однозначно определена. По сложившейся традиции, указывается концентрация водородных ионов. В очень кислых растворах их концентрация может достигать 1 или даже несколько молей на литр, но в нейтральных или щелочных средах она ничтожно мала, измеряясь значениями 10 в степени до минус 14. Такими величинами оперировать неудобно, поэтому вместо концентраций, выраженных в молях/л, используют отрицательные значения их десятичных логарифмов. Так как концентрации всегда меньше 1, их логарифмы отрицательные, знак минус просто отбрасывают. Эта величина называется показателем концентрации водородных ионов, или сокращенно pH.

В нейтральных растворах pH около 7 - в крови здоровых людей он колеблется в пределах 7,25-7,35. Кислыми называют растворы, pH которых ниже 5 - на вкус они действительно кислые, щелочными те, где pH выше 8.

С увеличением температуры константа диссоциации воды возрастает, соответственно увеличивается и концентрация водородных ионов, а pH уменьшается. Поэтому когда указывается точная концентрация водородных ионов в растворе или оптимальный pH какой-либо химической реакции, должна быть указана и температура, к которой эта величина относится, иначе сведения носят лишь приблизительный характер.

Способность молекул вещества диссоциировать с образованием ионов водорода или гидроксила зависит от концентрации водородных ионов: чем она больше (т.е. pH ниже), тем менее диссоциированы кислоты и сильнее диссоциированы основания. Целый ряд веществ, переходя из недиссоциированного состояния в ионизированное, меняет цвет, поэтому окраска раствора зависит от pH. Такие вещества называются кислотно-щелочными индикаторами, область значений pH, в которой происходит изменение цвета, называется зоной перехода. Обычно она около 2 единиц - при изменении концентрации водородных ионов в 100 раз во столько же раз меняется соотношение диссоциированной и недиссоциированной форм индикатора, на глаз это воспринимается как полное изменение цвета. Вне зоны перехода окраска индикатора стабильна. Многие химические реагенты, используемые в клинической лабораторной диагностике при проведении цветных реакций - например, бромкрезоловый зеленый или п-нитрофенол - одновременно являются индикаторами, поэтому небольшое изменение pH заметно сказывается на оптической плотности раствора.

Абсолютная концентрация водородных ионов в нейтральных растворах ничтожна, случайное попадание небольшого количества кислоты или щелочи может очень сильно сказаться на величине pH. Чтобы сделать

ее более устойчивой, используют смеси слабых кислот (или оснований) и их солей - так называемые буферные растворы, pH которых зависит от соотношения диссоциированной (соль) и недиссоциированной (слабая кислота или основание) форм.

Согласно закону действующих масс:

$$\frac{[A^-] \times [H^+]}{[AH]} = K,$$

где AH - кислота в недиссоциированной форме,

A^- - анион кислоты,

H^+ - водородный ион,

K- константа диссоциации кислоты.

Отсюда следует, что $[H^+] = \frac{[AH]}{[A^-]} \times K$, т.е. что концентрация водородных ионов определяется соотношением концентраций диссоциированной и недиссоциированной форм кислоты. Так как слабые кислоты мало диссоциированы, а их соли хорошо диссоциированы, то смешивая в разных соотношениях кислоту и ее соль можно получить раствор, в котором концентрация водородных ионов в несколько раз больше или меньше, чем константа диссоциации кислоты.

Оптимальными буферными свойствами обладают растворы, в которых количества недиссоциированной кислоты и ее аниона (т.е. соли) примерно одинаковы. Когда к нему добавляют немного кислоты (т.е. ионов H^+) *они связываются присутствующими в растворе анионами буферного* вещества A^-, в результате чего концентрация AH возрастает, а концентрация A^- соответственно уменьшается, однако, соотношение этих форм меняется мало, соответственно, мало изменяется и pH. Если же добавляется щелочь, т.е. ионы гидроксила OH^-, то, наоборот, количество AH уменьшается, а диссоциированной формы A возрастает, поскольку водородные ионы связываются гидроксильными с образованием воды H_2O.

Рассмотрим, как реализуются буферные свойства при добавлении к раствору небольшого количества щелочи, которое обозначим [B]. Очевидно, что в этом случае концентрация кислоты уменьшится на то же количество миллимолей, что было добавлено щелочи, и теперь в растворе будет присутствовать не [AH] недиссоциированной кислоты, а [AH]-[B].

Так как вся кислота, нейтрализованная прибавленной щелочью, превратилась в соль, то количество соли увеличилось на ту же величину, на которую уменьшилось количество кислоты, т.е. теперь ее стало не $[A^-]$, а

$[A^-]+[B]$. В данном случае концентрация соли выражается тем же символом $[A^-]$, что и концентрация аниона кислоты, так как соль целиком диссоциирована.

Таким образом, после прибавления щелочи к буферному раствору концентрация водородных ионов в нем оказывается:

$$[H^+] = \frac{[AH] - [B]}{[A^-] + [B]} \times K, \quad \text{а не} \quad [H^+] = \frac{[AH]}{[A^-]} \times K$$

как было до прибавления щелочи.

Изменение pH, очевидно, будет тем меньше, чем меньше количество прибавленной щелочи относительно присутствовавших в растворе кислоты и ее соли, причем максимальный буферный эффект будет в той точке, где количества кислоты и ее соли равны, а pH раствора численно равен константе диссоциации. По мере удаления от этой величины буферный эффект слабеет.

Приведенные рассуждения относятся и к тому случаю, когда добавляется не щелочь, а кислота.

Способность раствора противостоять прибавлению кислоты или щелочи называется его буферной емкостью или силой. Она выражается в миллимолях кислоты или щелочи, которые надо прибавить к 1 мл раствора, чтобы его pH изменился на 1 единицу.

При хранении растворов надо иметь в виду, что основными причинами, которые могут привести к случайному изменению pH, являются попадание угольной кислоты из воздуха и выщелачивание стекла. Углекислота воздуха сказывается главным образом на растворах, pH которых выше 7, поскольку более кислые растворы угольную кислоту не поглощают, уберечься от ее влияния проще всего, закрывая флаконы с реактивами пробками. Выщелачивание посуды зависит в первую очередь от сорта стекла, а также от длительности хранения реактива, оценить его влияние в условиях клинической лаборатории непросто, поэтому надо проявлять определенную осторожность. Пластмассовые флаконы, пробирки и кюветы, как правило, делаются из материала, который не выщелачивается.

Калибровка, калибровочный материал, калибровочный график

Когда реактивы, необходимые для выполнения избранного метода исследования, готовы, приступают к анализу калибровочных проб, по данным которых строят калибровочный график.

Большинство количественных клинических лабораторных методов исследования не являются абсолютными и предполагают калибровку с использованием калибровочных материалов. Исключение составляют, главным образом, те случаи, когда определяется физический показатель - плотность, масса, показатель преломления. Калибровочные материалы - это материалы, состав которых заранее известен и свойства которых "прослеживаемы", т.е. имеют доказанное соответствие свойствам стандарта того аналита, исследование которого осуществляется с помощью калибруемого метода. Стандартными образцами метрологи называют образцы, с которыми сравнивают исследуемые величины: например, метр для измерения длины или гири определенной массы для проверки весов. Существуют банки стандартных или первичных референтных материалов для ряда аналитов, исследуемых в клинических лабораториях(см. раздел "Реагенты"). различают первичные и вторичные калибровочные материалы. В первом случае речь идет о растворах, при изготовлении которых в их состав было введено определенное, точно измеренное взвешиванием количество анализируемого вещества. Исходным материалом для приготовления первичных калибровочных материалов должны служить стандарты исследуемых аналитов, что и обеспечивает "прослеживаемость" свойств калибровочного материала. В некоторых случаях первичные калибровочные материалы могут быть приготовлены непосредственно в лаборатории - например, когда для калибровки метода определения железа готовится раствор его хлористоводородной соли путем растворения навески железной проволоки в соляной кислоте. При этом точно известно, сколько грамм-молей железа содержится в одном литре раствора и он может непосредственно использоваться для калибровки.

Однако, не всегда удается приготовить такой калибратор. Например, очень трудно получить не содержащий воду и другие примеси пригодный для приготовления навески препарат даже такого относительно простого белка, как альбумин, не говоря уже о более сложных и специфических протеинах. В этом случае готовят раствор, содержащий нужное вещество в примерно подходящей концентрации, а затем определяют его состав, используя надежный метод - в случае альбумина определяют его чистоту методом электрофореза, а содержание белка по количеству азота после сжигания. Такой калибровочный раствор называют вторичным.

Для ряда аналитов сложилась система промышленного приготовления рабочих калибраторов, состав которых сверяется с созданными международными (или национальными) организациями эталонами. Надеж-

ное выполнение лабораторных анализов предполагает, что свойства вещества "прослежены" от международного эталона до конкретного материала, по которому калибруется метод в данной лаборатории.

Особые условия калибровки имеются для кинетических ферментных методов. Об активности ферментов судят по убыли или накоплению субстрата или продукта реакции, для облегчения работы подбирая такие вещества, концентрации которых легко оценить по физико-химическим свойствам раствора, чаще всего по его окраске.Обычно это вполне определенные соединения, из которых, казалось бы, несложно приготовить первичные калибраторы, но проблема осложняется тем, что оптическая плотность тех веществ, которые удобно определять (НАД, НАДФ, нитрофенол), очень зависит от состава окружающей среды, в первую очередь от концентрации водородных ионов. НАД в ряде случаев образует комплексы с присутствующими в растворе белками, что также влияет на его оптическую плотность. Учитывая сложность и дороговизну приготовления таких калибраторов, фирмы, изготавливающие наборы реактивов,не снабжают их калибраторами, а в описании методов указывают величину константы, на котрую нужно умножить скорость изменения оптической плотности, чтобы получить значение активности фермента. Поскольку способ расчета этих констант обычно не сообщается, клинические лаборатории не в состоянии проверить их правильность простым способом. Можно лишь использовать сравнение методов или наборов различных фирм-изготовителей, что довольно дорого и связано с большим расходом времени.

Калибровка обязательна при налаживании метода. Частота ее проведения в последующем зависит от конкретных обстоятельств. Она необходима при смене реактивов, а также если внутрилабораторный контроль качества исследований свидетельствует о наличии существенных погрешностей.

Следует иметь в виду, что результат калибровки может зависеть от качества калибровочного материала. Иногда промышленные фирмы предлагают калибровочные материалы пригодные только для одного метода, чаще всего для того, который служит основой набора реагентов, который комплектуется данным калибровочным материалом. Иногда эти материалы являются лишь имитаторами калибраторов, способными только в совершенно определенных условиях развивать окраску, похожую на ту, которая развивается при выполнении анализа. Изменение условий или использование таких "калибраторов" для других методов может быть источником грубых ошибок.

Следует четко соблюдать правило невозможности использования одного и того же материала в качестве калибровочного и контрольного. Контрольные материалы предназначены только для проверки правильности и воспроизводимости аналитического процесса, а не для калибровки метода (см. раздел "Управление качеством клинических лабораторных исследований"). Оба материала должны быть абсолютно независимы друг от друга.

Калибровка - это установление зависимости между непосредственными результатами измерения (например, окраской раствора или оптической плотностью) и концентрацией исследуемого вещества путем измерения нескольких (не менее двух) калибровочных растворов различной концентрации, что дает опорные точки, а промежуточные значения между ними вычисляются путем интерполяции.

В простейшем случае, когда работа выполняется вручную, строится калибровочный график. Для этого на одной оси откладывают концентрацию аналита, а на другой размер непосредственно полученных значений (например, оптической плотности). Соединив точки, отражающие реально выявленную зависимость между измеренными значениями и концентрацией аналита, получают линию, по которой далее ведут расчет. Задача значительно облегчается, если заранеее известно, что линия должна быть прямой. Прямая линия (линейный калибровочный график) облегчает интерполяцию, т.е. определение концентраций, которые соответствуют значениямы оптической плотности между калибровочными точками. Если точки не оказываются в точности на прямой линии, калибровочную линию проводят по линейке на глаз, так, чтобы линия была по возможности равно удалена (или одинаково близка) по отношению ко всем точкам. Этим достигается усреднение погрешности измерения.

Чтобы калибровочный график был прямой линией, т.е. калибровка была линейной, непосредственные результаты измерений предварительно математически обрабатывают. При фотометрии эта обработка сводится к замене количества прошедшего света величиной оптической плотности, которая пропорциональна концентрации вещества (закон Ламберта -Бера)(см. раздел "Основные аналитические технологии"). Современные приборы обычно сразу выдают значение оптической плотности, автоматически проводя подобные вычисления. Иногда используются более сложные математические способы предварительной обработки данных, чтобы добиться линейности калибровочного графика. В настоящее время клиническая лабораторная аналитика располагает

обширным арсеналом методов, которые при соблюдении условий выполнения анализа обеспечивают линейность калибровки (а значит и измерений содержания аналитов в биологических жидкостях) в широком диапазоне концентраций. Однако, в некоторых видах исследований, в частности, в турбидиметрических и иммуноферментных методах калибровка часто оказывается нелинейной, что осложняет расчет (см. раздел "Статистические методы").

В хорошо отработанных аналитических методах калибровочный график не только линеен, но и "проходит через нуль", т.е. если концентрация аналита равна нулю, то и показания прибора также равны нулю. Это облегчает построение калибровочного графика, так как достаточно только одной калибровочной пробы, поскольку одна точка уже существует - это нуль. При этом упрощаются и последующие расчеты, так как концентрация пропорциональна оптической плотности. В этом случае вычисляют константу или фактор расчета путем деления концентрации калибровочного раствора на его оптическую плотность, а при вычислении результатов опытных проб оптическую плотность просто умножают на найденную при калибровке величину.

Рекомендуется всегда строить калибровочный график по нескольким точкам, соответствующим области как нормальных, так и патологических значений концентрации аналита в биологической жидкости. Это служит залогом эффективности и линейности метода во всем диапазоне возможных значений.

Если калибровочный график не проходит через нуль, необходимо определить, является ли это результатом случайной погрешности, которой можно пренебречь, или это закономерное отклонение, вызванное, например, мутностью раствора, и пренебрежение им может вызвать систематическую погрешность. Вычислительные программы большинства автоматических анализаторов построены так, что калибровочный график обычно проходит через нуль. Калибровка этих приборов осуществляется с помощью встроенного микропроцессора. Используемые при этом математические приемы - см. в разделе "Статистические методы".

Если калибровочный график налаживаемого метода получился линейным и результаты воспроизводимы, можно переходить к исследованию биологического материала.

Литература

1.И.С. Балаховский // Основные правила проведения лабораторных анализов.// В кн.: "Лабораторные методы исследования в клинике, Справочник. // Под ред. В.В.Меньшикова// М. 1987, стр; 6-8.

2. С.Т.Ильина, Н.А.Макарова, А.М.Маркова // Совершенствование организации труда в клинико-диагностических лабораториях// В кн.: " Пути совершенствования деятельности клинико-диагностических лабораторий" // М. 1976, стр. 9-23.

3. В.Л. Войхонский и др.// В кн. "Медицинские лабораторные технологии. Справочник."// Под ред. А.И.Карпищенко// СПб, 1998,стр. 85 - 91.

4. E.W.Bermes, D.S.Young // General laboratory techniques and procedures // In: "Fundamentals of Clinical Chemistry". III-rd ed, N.W.Tietz (ed.) // Philadelphia, 1987, pp. 5-45.

ЛАБОРАТОРНЫЕ РЕАГЕНТЫ

В клинических лабораторных исследованиях используется широкий ассортимент различных химических реактивов, биологических препаратов, природных и синтетических веществ, от качества которых и соответствия их поставленным исследователем задачам зависит получение воспроизводимых, контролируемых, статистически достоверных и сравнимых результатов.

Требовании к качеству реактивов

Качество реактивов зависит от чистоты, активности, стабильности, а также от способа приготовления и упаковки. Эти требования к качеству образуют комплексную систему зависящих друг от друга параметров.

Чистота.

Понятие «чистота» носит относительный и условный характер. На практике вещество считают достаточно чистым, если оно не содержит примесей такого рода и в таких количествах, которые мешают использованию этого вещества для данной конкретной задачи.

Классификация чистых веществ, действующая в нашей стране, базируется на использовании групп аналитических методов, различающихся своей чувствительностью:

класс А — вещества, содержание основного компонента в которых определяется прямыми методами, а примесей — химическими методами;

класс В — вещества, в которых непосредственно определяются только примеси, причем спектральными и физико-химическими методами;

класс С — вещества, анализ примесей в которых осуществляется методами наивысшей чувствительности (радиоактивационный, кинетический анализ и др.).

Для химических реактивов, т. е. веществ, используемых в аналитических и научно-исследовательских работах для качественного и количественного определения других веществ, принята следующая квалификация:

— «чистый» (ч) — содержание основного вещества не менее 98%, допустимое содержание примесей в пределах 0,01—0,05%; реактивы квалификации «ч» используют, главным образом, для препаративных и учебных целей;

— «чистый для анализа» (чда) — содержание основного вещества не менее 99%, содержание отдельных примесей не превышает допустимого предела, позволяющего проводить точные аналитические исследования; реактивы квалификации «чда» используются в аналитической практике;

— «химически чистый» (хч) — содержание основного вещества более 99%, содержание отдельных примесей в пределах 0,001—0,00001%.

Лимитируются те примеси, которые наиболее характерны для данного реактива или явно нежелательны в важнейших областях его применения. Следует помнить, что если содержание основного вещества, например, 99,8%, то это не значит, что содержание примесей составляет 0,2%. Здесь учитываются пределы погрешности при прямом определении вещества.

Для высокочистых веществ принята следующая квалификация:

— «эталонно чистый» (взч) — максимальное содержание основного вещества и предельно минимальное содержание нежелательных примесей устанавливаются в зависимости от назначения эталона;

— «особо чистый» (осч) — минимальное содержание отдельных примесей (от 0,00001 до 0,00000000001%) и максимально допустимая сумма определяемых примесей.

Анализ малых концентраций примесей возможен только с помощью физических методов (эмиссионная спектроскопия, радиоактивационный анализ и др.). Содержание основного вещества в этих квалификациях нельзя определить прямым анализом, и его устанавливают по разности между 100% и суммой определяемых примесей, т. е. фактическое содержание основного вещества условно и зависит от полноты анализа примесей. Кроме квалификации, иногда указывают область применения или отсутствие какой-либо примеси (например, «для хроматографии», «индикатор», «фармакопейный» и т. д.).

Показатели качества отечественных реактивов приведены в соответствующих ГОСТах или ТУ на эти реактивы.

Квалификация реактивов, импортируемых из-за рубежа, указывается на латинском языке или языке страны. В большинстве каталогов ре-

активов приводятся градации чистоты, принятые данной фирмой, и их характеристика.

Наиболее часто встречаются следующие обозначения:

analitical grade, p. a., A. R. — реактивы для аналитических работ;

research grade, reinst. — лабораторные реагенты высокого качества для исследовательских и рутинных целей, а также коммерческие препараты, отвечающие фармакопейным требованиям;

pure, rein — очищенные коммерческие препараты с содержанием основного вещества около 95%, широко используемые в лабораториях;

puriss. — реагенты с содержанием основного вещества около 99%, предназначенные для проведения точных работ;

pract. — коммерческие препараты с содержанием основного вещества в пределах 90—95%, предназначенные, в основном, для синтеза;

tech. — технические реагенты.

Активность

В клинических лабораторных исследованиях широко используются ферменты (энзимы) — биологические катализаторы, являющиеся по химической природе белками. В молекулах ферментов имеются участки — активные центры — непосредственно взаимодействующие с субстратами. Критерием чистоты для ферментов является их специфическая (удельная) каталитическая активность с дополнительной информацией о каталитической активности загрязняющих ферментов, выраженной в процентах от специфической каталитической активности основного фермента.

Указания на «побочную активность» и кристаллическое состояние не являются критериями чистоты, а лишь характеристиками фермента.

В состав некоторых ферментов входят органические соединения небелковой природы — коферменты. Соединяясь с белковой частью фермента — апоферментом — они образуют каталитически активные комплексы.

Апоферменты определяют специфичность действия фермента и возможность регуляции его активности.

Чистоту коферментов и субстратов лучше определять методами энзиматического анализа в сочетании с определением катионов и воды.

Стабильность

Стабильность реагентов зависит от природы веществ, чистоты и условий хранения. Устойчивость твердых веществ значительно больше, чем их растворов. Одно и то же вещество в различных образцах может иметь различную стабильность, а различные компоненты в одном и том же об-

разце имеют различную стабильность. Соблюдение условий хранения, обычно указанных на этикетках, обеспечивает неизменность качества реагентов в течение декларированного срока хранения.

Растворы

В лабораторной практике используются в основном растворы реагентов.

Раствор — устойчивая однофазная система переменного состава, состоящая из двух или более компонентов (растворителя и растворенных веществ). Растворы занимают промежуточное состояние между механическими смесями и химическими соединениями.

Количественный состав раствора определяется его концентрацией.

Основные способы выражения концентрации:

Весовые проценты — число весовых частей растворенного вещества в 100 весовых частях раствора

Моляльность — число молей растворенного вещества, содержащихся в 1 кг растворителя

Молярность — число молей растворенного вещества, содержащихся в 1 л раствора

Нормальность — число грамм-эквивалентов растворенного вещества в 1 л раствора

Титр — количество граммов растворенного вещества, содержащегося в 1 $см^3$ раствора

Для приготовления растворов в клинической химии используют воду.

Для получения чистой воды используют различные методы:

фильтрование — удаляются только нерастворимые примеси;

дистилляция — перегонка для удаления растворенных веществ;

деминерализация — последовательное удаление содержащихся в воде катионов и анионов с помощью колонок, заполненных ионитами (чаще всего синтетическими ионообменными смолами — анионитами и катионитами).

В лабораториях используют чаще всего дистиллированную воду, иногда бидистиллированную, т. е. перегнанную дважды. Наиболее практична и экономична очистка воды с помощью коммерческих систем (например, «Millipore System», «Organic pure» от фирмы «Barnstead», «Ultra pure water» от фирмы «Elga Group» и др.(рис. 1,2)).

Эти системы содержат фильтры из активированного угля для адсорбции органических веществ, смесь ионитов в виде шариков и мембранный фильтр для удаления микроорганизмов.

Рис.1. Система " AFSTM -3 Analyser Feed Systems" ("Millipore") производительностью 3 л в час, для прямого снабжения лабораторных анализаторов очищенной водой. —содержит активированный уголь, тонкослойную композитную мембрану для удаления ионов-загрязнителей и органических примесей , ионообменные смолы для полного удаления всех неорганических веществ.

Всегда нужно использовать свежеприготовленную воду. Для некоторых анализов требуется вода, не содержащая CO_2 (для pH-метрии). В этом случае бидистиллят кипятят в течение 5—10 мин, охлаждают без доступа воздуха и используют в течение нескольких часов.

Для методов флуорометрии воду получают путем дистилляции 20% раствора $KMnO_4$. Марганцовка окисляет присутствующие в воде флуоресцирующие соединения.

Рис. 2. Лабораторная система очистки воды "Direct -QTM" ("Millipore") производительностью 0,6 л/мин ультрачистой воды , пригодной для приготовления буферных растворов(в том числе для жидкостной хроматографии и электрофореза), холостых проб и калибровочных материалов для спектрофотометрии, высокопроизводительной жидкостной хроматографии, сред для культур.

Большинство сортов фильтровальной бумаги (исключая специальную бумагу для хроматографии) содержат примеси флуоресцирующих материалов и не должны использоваться для удаления твердых примесей.

Рекомендуется использовать пробки из силиконовой резины или полиэтилена.

Во избежание попадания загрязнений (аэробных бактерий, химических соединений, CO_2, паров растворителей) растворы, как и реагенты вообще, следует хранить плотно закрытыми.

Стабильность растворов зависит от их концентрации. Основные растворы при хранении в холодильнике стабильны в течение нескольких недель до нескольких месяцев, в зависимости от природы растворенных веществ. Рабочие растворы используют обычно в течение одного или нескольких дней.

Для приготовления многих растворов в качестве растворителя используются буферные растворы — водные растворы, сохраняющие определенную концентрацию ионов H^+ (pH) при добавлении небольших количеств сильных кислот и щелочей.

Они представляют собой растворы слабой кислоты и ее соли, или слабого основания и его соли, взятых в определенном соотношении.

Буферные растворы также можно составлять из смеси солей многоосновной кислоты, константы диссоциации которой сильно отличаются друг от друга, например, из смеси одно- и двузамещенных фосфатов.

При разведении (до соотношения 1:100) pH буферного раствора практически не меняется, однако отражается на его емкости.

Буферная емкость — число молей сильной кислоты или сильного основания, добавление которого к буферному раствору изменяет его pH на единицу.

Буферная емкость тем больше, чем концентрированнее раствор.

Буферные смеси не при всех соотношениях концентраций кислоты и соли проявляют свое буферное действие. Его оптимум отвечает той концентрации $[H^+]$, при которой кислота является наполовину нейтрализованной.

Для приготовления буферных растворов необходимо использовать дважды перекристаллизованные реактивы квалификации «хч» и бидистиллированную воду; значение pH — контролировать потенциометрически.

Буферные растворы используются в тех случаях, когда анализ проводится при определенном значении pH, в частности в фотометрических методах, основанных на цветных индикаторных реакциях.

Индикаторами называются соединения, окраска которых изменяется в зависимости от изменения pH среды. Они принадлежат к различным типам органических соединений, но все — являются слабыми кислотами или слабыми основаниями. Их недиссоциированные молекулы окрашены иначе, чем диссоциированные. Но диссоциация не является единственной причиной изменения окраски. Согласно хромофорной теории индикаторов, окраска вещества, как и многие другие физические свойства, зависит от состава и строения молекулы.

Для получения окрашенных органических веществ необходимо присутствие в их молекуле определенных групп атомов — хромофоров. В таблице №1 представлены кислотно-основные индикаторы и области pH в которых они действуют.

Тип приготовления

Основные требования при выборе типа приготовления — максимальная простота в использовании реагента и гарантия наивысшего (по возможности) качества. Например, вещества в кристаллической форме легче взвешивать, чем лиофилизированные; использование готовых таблеток исключает взвешивание, но таблетки должны быстро и полностью растворяться. Гарантия качества связана с простотой приготовления, стабильностью и активностью. Растворы ферментов легче использовать, чем суспензию. Добавление к растворам консервантов исключает ежедневное приготовление, но консерванты не должны влиять на ход аналитического процесса.

Упаковка

Упаковочный материал для изготовления флаконов, ампул, пузырьков, пробок должен выбираться с учетом свойств реагентов. Ни один компонент упаковки не должен влиять на содержимое. Упаковка должна эффективно защищать от вредных внешних воздействий (свет, влага, атмосферный воздух и т. д.).

Готовые аналитические формы реактивов

Наборы реактивов

Набор реактивов — это два или более лабораторных материалов, упакованных вместе, предназначенных для выполнения определенной процедуры и снабженные инструкцией.

Основными преимуществами использования готовых наборов реактивов являются:

Таблица 1

Кислотно-основные индикаторы и области pH, в которых они действуют.

Индикатор	Область pH	Цвет	
		в кислой в среде	в основной среде
Бриллиантовый крезиловый синий (кислота)	0,0-1,0	Красно-оранжевый	Синий
Крезоловый красный (кислота)	0,2-1,8	Красный	Желтый
Хиналдиновый красный	1,0-2,0	Бесцветный	Красный
Тимоловый синий (кислота)	1,2-2,8	Красный	Желтый
Тропеолиновый ОО	1,3-3,0	-"-	-"-
Метакрезоловый пурпурный	1,2-2,8	-"-	-"-
Бромфеноловый синий	2,8-4,6	Желтый	Синий
Метиловый желтый	*2,9-4,0*	*Красный*	*Желтый*
Метиловый оранжевый	3,1-4,4	-"-	-"-
Конго красный	3,0-5,0	Фиолетовый	Красный
Бромкрезоловый зеленый	3,8-5,4	Желтый	Синий
Метиловый красный	4,2-6,3	Красный	Желтый
Хлорфеноловый красный	4,8-6,4	Желтый	Красный
п-Нитрофеноловый	5,6-7,6	Бесцветный	Желтый
Бромкрезоловый пурпуровый	5,2-6,8	Желтый	Пурпуровый
Азолитмин (лакмус)	5,0-8,0	Красный	Синий
Бромтимоловый синий	6,0-7,6	Желтый	-"-
Нейтральный красный	6,8-8,0	Красный	Оранжевый
Феноловый красный	*6,8-8,4*	*Желтый*	*Красный*
Крезоловый красный (основание)	7,2-8,8	-"-	-"-
α-Нафтофталеин	7,3-8,7	-"-	Синий
Тимоловый синий (основание)	8,0-9,6	-"-	-"-
Фенолфталеин	8,3-10,0	Бесцветный	Красный
Куркумовый	8,0-10,0	Желтый	Оранжевый
Тимолфталеин	8,3-10,5	Бесцветный	Синий
Ализариновый желтый R	10,1-12,0	Желтый	Красно-оранжеый
Бриллиантовый крезиловый - синий (основание)	10,8-12,0	Синий	Желтый
Тропеолин	*10,8-12,0*	*Желтый*	*Оранжевый*
Нитрамин	10,8-13,0	Бесцветный	Буро-оранжевый

— сокращение расхода реактивов;

— сокращение времени анализа за счет исключения этапов приготовления реактивов;

— гарантия высокого качества, так как производители используют тщательно контролируемые реагенты, дают информацию об ограничениях применения, об интерференции патологических метаболитов и лекарств, о внешней оценке качества набора, выполненной самим производителем и профессиональными организациями.

Многие современные методы, используемые в клинической лабораторной диагностике, например, для определения гормонов, опухолевых маркеров и т. п., могут быть выполнены только с помощью готовых наборов, так как в условиях лаборатории невозможно приготовить все необходимые компоненты соответствующего качества для проведения анализа. Кроме того, приготовленные в лаборатории реагенты не пригодны для многих автоанализаторов.

Основные требования к наборам реактивов

При промышленном производстве готовых наборов реактивов необходимо соблюдать баланс между стоимостью, качеством и надежностью получаемых результатов, удобством применения (практичностью) и низкой интерференцией.

Практичность применения и низкая интерференция зависят от выбора метода, качество и надежность результатов — от качества и стабильности реагентов и их растворов.

Срок хранения набора при определенных условиях (например, в холодильнике) должен быть не менее 6 мес со дня выпуска.

Стабильность рабочих растворов должна сохраняться в течение недели (если возможно) и, по крайней мере, в течение рабочего дня.

Виды наборов

Простейший вид набора — каждый реактив в виде порошка, гранул, таблеток, лиофилизатов или раствора упакован в отдельный флакон (рис.3). В случае использования растворов к ним добавляются консерванты, стабилизаторы (например, глицерин или этиленгликоль для ферментов). Такие наборы сокращают лишь время на взвешивание реактивов.

Дальнейшее упрощение состава набора — использование комбинации таких компонентов, которые не реагируют друг с другом, т. е. приготовление стабильных смесей. Это позволяет сократить число пипетирований и связанных с этим ошибок.

Рис. 3. Пример набора реактивов для определения одного аналита : "Turbox kit" ("Orion") для определения С-реактивного белка. В набор входит: антисыворотка, калибратор, буфер для холостой пробы, буфер для реакционной смеси ; все в расчете на 60 определений.

В настоящее время созданы наборы, которые содержат в одном флаконе все необходимые реагенты в сухом или растворенном виде. Однако в ряде случаев в зависимости от свойств реагентов и принципа реакции такая комбинация невозможна. Например, в наборах для определения активности аминотрансфераз α-кетоглутарат, используемый в качестве стартера, фасуется отдельно.

В состав многих наборов, например, наборов для определения метаболитов, включается калибровочный раствор.

Для проведения анализов с помощью готовых наборов часто требуются дополнительные реагенты, не включенные в состав набора (например, растворы кислот и щелочей). В прилагаемых к набору инструкциях содержатся соответствующие указания.

Стабилизация реактивов в наборах достигается различными способами — иммобилизацией реагентов путем фиксации на бумаге, стенках пробирок, магнитных частицах.

В наборах реактивов, основанных на методах иммуноферментного анализа (ИФА), антигены и антитела связываются ковалентно или другим способом с внутренней поверхностью пробирок или лунок планшета (рис. 4). Преимуществом такой процедуры является то, что все интерферирующие компоненты образца и реакционной смеси вымываются после реакции связывания, а чистый комплекс антитело-антиген остается на поверхности пробирки.

Пробирки с нанесенными на их внутреннюю поверхность окислительными агентами представляют собой другой пример связывания реагента с поверхностью пробирки. Преинкубация образцов мочи в таких

Рис. 4. Пример набора для определения нескольких аналитов : Тест-системы для иммуноферментного определения онкомаркеров (CanAg , Швеция; дистрибьютор "Био-Лайн"). В набор входят : 96 -микролуночный планшет (разборный по 8-луночным стрипам), покрытый стрептавидином в качестве твердой фазы, моноклональные антитела, конъюгированные с биотином; набор калибраторов; моноклональные антитела, конъюгированные с ферментом (пероксидаза хрена); однокомпонентный хромогенный субстрат; концентрированный раствор для отмывки планшета; останавливающий раствор.

пробирках позволяет определить те компоненты мочи, на которые влияют восстанавливающие вещества, как, например, аскорбиновая кислота.

Специальная бумажная технология применяется в наборах реактивов типа «Перидохром» (Peridochrom), в состав которых входит буферный раствор и бумажные полоски с нанесенными на них реагентами, адсорбированными на различные зоны. В таких наборах все реагенты отделены друг от друга, что исключает их взаимную интерференцию, хорошо стабилизированы, так как зафиксированы на бумаге в оптимальных для них условиях.

На практике реагенты готовятся к употреблению путем погружения полоски в соответствующую аликвоту буфера.

Наборы типа «Перидохром» выпускала, например, фирма «Берингер Маннхайм»(ныне «Рош Диагностикс») для определения холестерина и мочевой кислоты.

Другой тип готовых аналитических форм — диагностические полоски, основанные на принципах «сухой химии» (см. соответствующий раздел).

Наборы реактивов, предназначенные для ручного выполнения, могут быть адаптированы к открытым автоматизированным системам, чаще всего путем пропорционального уменьшения объемов пробы и реактивов.

Для закрытых аналитических систем, представляющих собой комбинацию прибора и реагентов, выпускаются специальные наборы реактивов, и другие реактивы не могут использоваться в таких системах.

Например, в анализаторах ACA-System of Du Point de Nemours, США, используется принцип колоночной хроматографии. Исследуемый образец пропускают через маленькую готовую к употреблению колонку, интерферирующие вещества остаются на ионообменной смоле или молекулярном сите.

В системе «Parallel» фирмы «American Monitor» используется трехволновая процедура измерения для подсчета концентрации интерферирующего хромогена, что позволяет скорректировать результаты.

Многие фирмы выпускают готовые наборы реактивов для различных типов анализаторов, в том числе и в крупных фасовках (для высокопроизводительных анализаторов).

Требования к качеству готовых наборов реактивов

Использование готовых наборов в повседневной практике лабораторий имеет свои преимущества только в случае гарантии их качества, за которое отвечают производители наборов. Качество наборов реактивов обеспечивается:

— контролируемым на всех этапах технологическим процессом их приготовления;

— соответствующей маркировкой;

— использованием методик, позволяющих определить степень чистоты исходных материалов, промежуточных и конечных продуктов;

— системой контроля за всеми стадиями разработки и доставки, начиная с поставки сырья и до отправки готовой продукции.

Контроль качества исходных материалов

Все реактивы и биопрепараты, используемые для производства, должны быть проанализированы на соответствие спецификациям (определение чистоты, физических параметров, тест на идентичность, содержание примесей) с использованием различных аналитических методик и функциональных тестов.

Контроль качества упаковочных материалов

Упаковочные материалы, находящиеся в контакте с реагентами, должны проверяться на физические параметры (внешний вид, чистота, размеры, растяжение). Кроме того, необходимо удостовериться, что никакие веществ, способные загрязнить реактивы, не могут выделиться из упаковки.

Контроль процесса производства

В процессе производства необходим контроль за тем, чтобы все ингредиенты добавлялись в требуемом количестве и в соответствии с инструкцией.

Окончательный контроль качества

Он включает следующие этапы:

— контроль репрезентативной выборки из различных флаконов, входящих в один набор;

— визуальный контроль набора, флаконов и маркировки;

— проверка содержимого различных флаконов;

— проверка идентичности всех ингредиентов;

— проверка количественного содержания всех основных компонентов набора;

— оценка аналитической надежности теста с использованием контрольных сывороток и сывороток пациентов, проверка линейности и обнаружения;

— проверка стабильности.

Маркировка реагентов и наборов реактивов

Общие принципы и рекомендации по маркировке клинических лабораторных материалов, наборов, компонентов наборов, калибраторов, референтных материалов, контрольных материалов разработаны Всемирной организацией здравоохранения (WHO). В нашей стране маркировка реактивов производится в соответствии с ГОСТ «Правила приемки, отбор проб, фасовка, упаковка и маркировка».

Маркировка включает этикетки и инструкции по применению.

Для химических и биологических материалов этикетка должна содержать следующие сведения: наименование продукта и его назначение, квалификацию, количественные характеристики (вес, объем, концентрация, активность и т. д.), номер партии, предприятие (фирма)—изготовитель и его адрес, условия и срок хранения, а также, при необходимости, предупреждающие надписи («Огнеопасно», «Беречь от воды», «Ядовито» и т. п.).

Для наборов реактивов этикетка на контейнере должна содержать дополнительно: номер партии или контрольный номер (в том числе на каждом компоненте в составе набора); срок хранения, который зависит от срока хранения самого неустойчивого компонента в наборе, состав набора.

Содержание инструкции к набору

1. Наименование и назначение.

2. Химический, физический или биологический принцип, в том числе уравнения реакций, ссылки на литературный источник.

3. Указания по технике безопасности при работе с набором (если необходимо).

4. Стабильность. Если возможно, приводятся физические, биологические или химические признаки нестабильности и порчи реактивов.

5. Для каждого компонента набора должны быть указаны: наименование, количество (концентрация или активность), источник, специфичность, чувствительность или другие характеристики, влияющие на выполнение теста. Любые добавки, не участвующие в реакции (например, буфер, консервант, стабилизатор), которые могут повлиять на тест, должны быть идентифицированы и охарактеризованы; описание процедуры растворения и смешивания.

6. Оборудование. Описание любых специальных требований к оборудованию, чтобы пользователь мог сделать соответствующий выбор.

7. Способ отбора исследуемого образца, подготовка пациента, рекомендуемые добавки (антикоагулянты, консерванты), рекомендации по хранению, транспортировке образца, интерферирующие вещества.

8. Детальное описание процедуры выполнения теста, включая:

— специальную обработку образца, который может содержать известные интерферирующие вещества;

— растворение, разведение, смешивание и другие необходимые этапы, включая условия и сроки хранения растворов;

— процедуру калибровки, включая выбор и приготовление калибратора, использование холостой пробы, построение калибровочной кривой;

— процедуру контроля качества, включая рекомендации по выбору контрольных материалов;

— перечень экспериментальных условий для выполнения теста: температура, время, необходимое для проведения различных этапов, длина волны измерения, стабильность финальной реакционной смеси;

— способ расчета результатов, включая объяснение каждого фактора и этапа расчета (могут быть приведены примеры расчета);
— технические указания, позволяющие более эффективно выполнить процедуру;
— литературные ссылки.

9. Преимущества, ограничения применения набора, оценку аналитической надежности, включающую воспроизводимость, правильность (сравнение с референтным методом, если возможно), специфичность, пределы обнаружения, линейность, чувствительность, ограничения метода (например, возможность перекрестных реакций).

10. Наименование и адрес изготовителя.

11. Дату (месяц, год) выпуска инструкции.

12. Нормальные значения.

Принципы выбора наборов реактивов

В условиях рыночной экономики клинико-диагностические лаборатории имеют возможность широкого выбора готовых наборов реактивов отечественного и зарубежного производства. Достоверность результатов лабораторных исследований зависит от аналитической надежности метода (правильности, воспроизводимости, специфичности, чувствительности) и его практичности (время анализа, технологические требования, стоимость и т. п.).

Надежность и практичность могут вступать в конфликт в отношении стоимости. Всегда следует отдавать предпочтение надежности метода.

При выборе набора реактивов следует в первую очередь учесть принцип метода, *положенный в основу набора, и его надежность. Если критерии* аналитической надежности подтверждены, необходимо оценить практичность набора, особенно с точки зрения экономии времени анализа и сокращения числа этапов исследования.

Практичность зависит от:
— стоимости;
— времени анализа;
— числа пипетирований;
— необходимости депротеинизации;
— необходимости нагревания (времени инкубации);
— необходимости постановки холостой пробы, пробы на сыворотку;
— зависимости от типа оборудования;
— возможности автоматизации;

— наличия реактивов, их стабильности, необходимости в дополнительных реактивах;
— необходимости и наличия калибратора;
— объема исследуемого образца;
— безопасности (агрессивность веществ);
— линейности и диапазона определения;
— числа определений, на которое рассчитан набор;
— срока и условий хранения набора и рабочих реагентов.

Принципы и применение систем «сухой химии»

Одним из современных направлений в клинической химии является развитие лабораторных тестов на твердофазных носителях реактивов, условно называемых системами «сухой химии» (синонимы «bed-side-tests», «dipsticks», «strip tests», а в последние годы «dry reagent chemistry» или «dry Chemistry»). Они предназначены для качественного, полуколичественного и количественного определения биохимических компонентов в биологических жидкостях.

В этих системах все реагенты нанесены на подложку в необходимом количестве в твердой фазе.

Поскольку химические реакции протекают в основном в жидкой среде, в системах «сухой химии» растворителем служит исследуемая биожидкость.

Прообразом систем «сухой химии» могут служить лакмусные бумажки для определения pH растворов, разработанные еще в XIX веке. Среди первых диагностических тестов на твердофазном носителе реактивов были бумажные полоски для качественного определения сахара в моче, а затем и других ее компонентов. Оценка результатов производилась по изменению окраски реакционной зоны. Введение цветных шкал для визуальной оценки позволило проводить полуколичественные определения. Такие экспресс-тесты в виде моно- (на один компонент) и политестов (на несколько компонентов) для исследования мочи (pH, кетоны, глюкоза, белок, билирубин, уробилиноген, эритроциты, гемоглобин, нитриты, удельный вес) и некоторых компонентов в сыворотке крови (например, мочевина, глюкоза, псевдохолинэстераза) выпускаются многими фирмами («Лахема», Чехия, «Рош Диагностикс», «Мерк», Германия, «Ames», США и др.).

Дальнейшее развитие систем «сухой химии» и переход к количественному определению связаны с разработкой измерительных приборов, основанных на принципах отражательной фотометрии, флюоресцентной

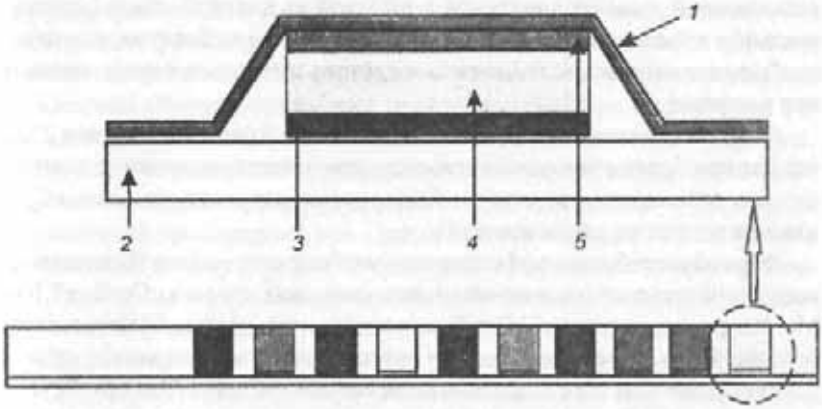


Рис. 5. Схема тест-полоски для исследования мочи Combur 10 Test (" Roche Diagnostics").
1 - нейлоновая сетка, 2 - подложка, 3 - абсорбирующая бумага, 4 - бумага с реагентом, 5 - сетчатый слой, содержащий иод.

спектроскопии, кондуктометрии, а также разработкой различных типов твердофазных носителей реактивов.

Практически все системы «сухой химии» состоят из трех основных частей: реактивной, отражательной и подложки.

Разработка систем «сухой химии» проводится по двум основным направлениям: с применением импрегнированных волокон и с использованием многослойных слайдов.

В *экспресс-тестах первого типа в качестве носителя используют импрегнированные* волокна из чистой альфа-целлюлозы. Бумажные матрицы имеют стандартную плотность волокон и определенную толщину. Реактивы абсорбируются на носителе путем погружения в соответствующие растворы с последующим высушиванием. Эти системы часто зависят от обьема исследуемой биожидкости, особенно если они основаны на методах определения по конечной точке.

В диагностических полосках фирмы «Рош Диагностикс» (рис. 5) чувствительная реакционная зона защищена от контакта, загрязнений и царапин специальной нейлоновой сеткой, которая также обеспечивает быстрое и однородное проникновение мочи и равномерное развитие окраски реакционной зоны. Бумажная подложка, содержащая абсорбент, предотвращает интерференцию и удаляет избыток мочи. Изменения цвета

реакционной зоны сравниваются с окраской на цветной шкале (при визуальном определении). Предел чувствительности выбран так, что даже слабые патологические изменения в составе мочи дают четкие изменения в окраске.

Анализ проводится в свежесобранной моче (хранение не более 2 ч), так как при более длительном хранении происходит разрушение эритроцитов и лейкоцитов, увеличение бактериурии, редукция глюкозы, образование нитритов, увеличение pH.

Фирмой разработаны эффективные и удобные системы для количественного уринализа с использованием диагностических полосок «Combur[10] Test M». Например, система «Urilux S» с производительностью 50 ан/ч, в которой инкубация, измерение и подсчет результатов автоматизированы; калибровка осуществляется специальными полосками «Control-Test M». Другая полностью автоматизированная система для уринанализа «Supertron» с производительностью 300 ан/ч. Первый результат выдается через 2 мин, объем пробы — 6 мл, для педиатрии — 3 мл. В барабане может храниться до 200 полосок, которые подаются автоматически для определения, калибровка проводится 1 раз в 2 недели; система позволяет определить 10 параметров *мочи при температуре измерения от 18 до 32°С и различных длинах волн: 555 нм, 620 нм, 660 нм.*

Экспресс-тесты на основе бумажных полосок, помещенных на пластиковые подложки, и различные отражательные фотометры выпускает, например, фирма «Эймс», США. Система «Серолайзер», включающая диагностические полоски и прибор, предназначена для определения компонентов в разведенной плазме или сыворотке крови с использованием методов измерения как по конечной точке, так и кинетических. Гемоглобин определяется в цельной крови. Исследуемую пробу наносят на реакционную зону диагностической полоски и помещают в прибор, в котором она облучается полихроматическим светом, диффузионно отраженный свет собирается на измерительной системе, имеющей сферическую *геометрию, и после прохождения через интерферирующий фильтр изме*ряется и сравнивается со стандартом. Система контролируется микропроцессором. Для каждого теста имеется специальный меченый модуль, содержащий фильтр для выбора длины волны измерения, и запоминающее устройство, содержащее специфические данные для теста. Прибор калибруется посредством двухточечного измерения с помощью растворов с «низкой» и «высокой» концентрацией компонента. Время реакции — от 4 ч до 4 мин в зависимости от теста.

Фирмой «Рош Диагностикс» (Швейцария) разработаны различные отражательные фотометры (например, «Рефломат», «Рефлочек» и др.) и диагностические полоски для определения различных компонентов в крови.

Система «Рефлотест» явилась первой системой для определения нескольких компонентов в цельной капиллярной или венозной крови (рис. 6). Это стало возможным благодаря использованию дополнительного фильтрующего слоя из стекловолокна, отделяющего эритроциты от плазмы под воздействием капиллярных сил. Цельную кровь в объеме 30 мкл наносят на реакционную зону диагностической полоски и помещают в прибор. После прохождения через разделительный слой плазма собирается в резервуар. Реакция начинается при вдавливании реакционного слоя в плазму.

На реакционное поле падает монохроматический луч от трех различных излучающих диодов. Диффузионно отраженный свет собирается в сферической измерительной системе. На каждом носителе реактивов на внутренней стороне имеется магнитная кодовая полоска, содержащая всю информацию, необходимую для автоматической калибровки, проведения реакции и вычисления результатов. Прибор снабжен микропроцессором.

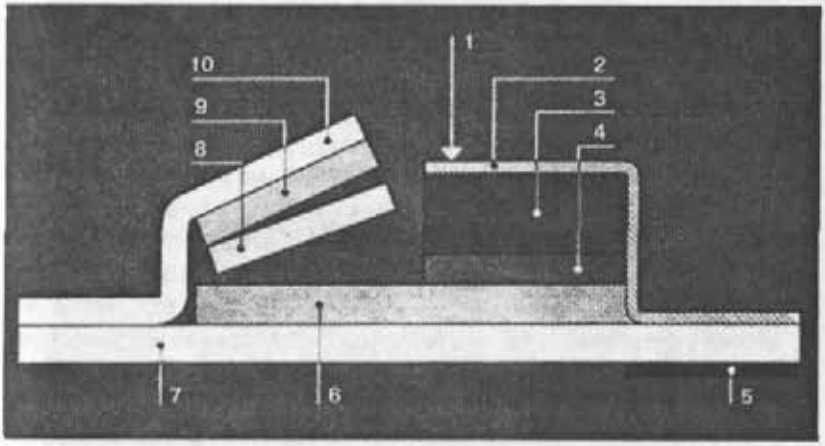


Рис. 6. Схема тест-полоски для исследования крови Reflotest (" Roche Diagnostics").

1 - кровь; 2 - защитное покрытие; 3 - материал для отделения плазмы от клеток крови; 4 - дополнительный реактив; 5 - магнитный код; 6 - транспортный слой для плазмы крови; 7 - подложка; 8 - слой с реагентом II; 9 - слой с реагентом I; 10 - прозрачная пленка.

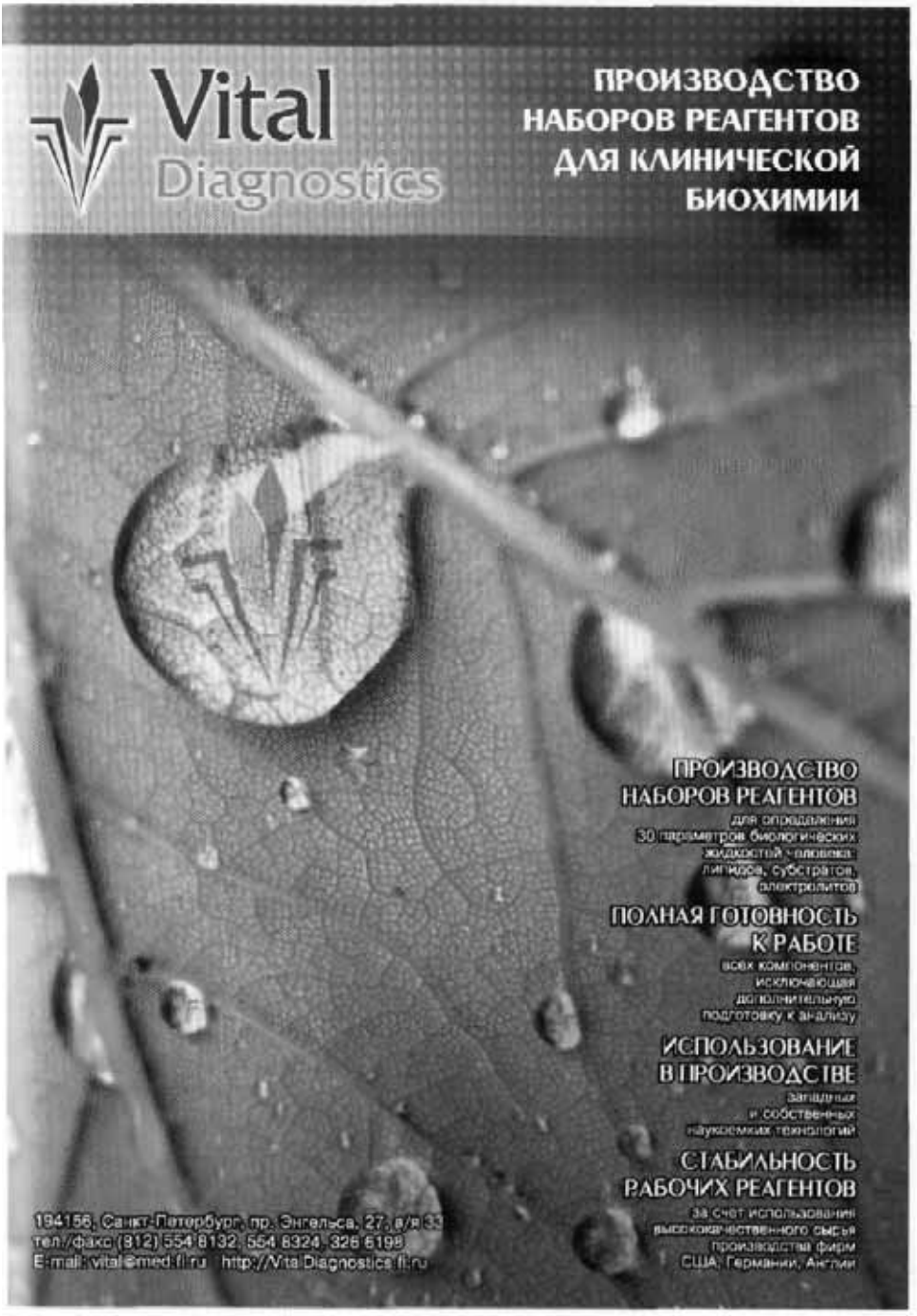
Эти системы «сухой химии» позволяют определить количественно различные компоненты биожидкостей: субстраты (глюкоза, мочевина, билирубин и его фракции, креатинин, белок, триглицериды, холестерин, альбумин), ферменты (амилаза, АлАТ, АсАТ, ЛДГ, КК и КК-В, гамма-ГТ, липаза, щелочная фосфатаза), ионы (фосфор, кальций, аммиак), лекарства (фенобарбитал, теофиллин и др.).

В диагностических полосках второго типа, представляющих собой многослойные пленки, в качестве подложки используют негнущийся пластик или другой подобный пластику материал, который может быть прозрачным или отражающим (перекрестно связанный желатин, агароза, поливиниловый спирт, алгинат, поливинилпирролидон или ацетат целлюлозы).

Для усиления отражения поры пластика заполняют неорганическим пигментом, чаще всего двуокисью титана. В этом случае подложка играет роль отражательного слоя. Падающий луч света отражается на детекторную систему без каких-либо потерь в результате абсорбции, что обеспечивает высокую чувствительность измерения. Реактивная часть системы может состоять из нескольких слоев пленок, содержащих необходимые реагенты в сухой форме. Иногда в систему включены дополнительные промежуточные слои, предназначенные для определения разрушения или маскировки интерферирующих веществ, содержащихся в исследуемой пробе, а также слой, обеспечивающий равномерное проникновение биожидкости в реактивный слой. В процессе производства реагенты наносят на матрицу путем погружения в соответствующие растворы или внедрения реактивов в синтетическую пленочную матрицу. Отдельные слои с помощью самоклеющихся пленок или одновременно все слои посредством специальной рамки объединяют в «слайды». Из-за наличия остаточной влаги в полимерных матрицах эти «слайды» хранят при низкой температуре герметически закупоренными. Результаты определений с помощью таких многослойных «слайдов» менее зависят от объема исследуемой биожидкости, чем при использовании экспресс-тестов первого типа.

Многослойные пленки, объединенные в слайд размером примерно с почтовую марку, были впервые разработаны фирмой «Кодак», США, широко известного производителя фотопленок и фотоаппаратов.

Система «Кодак Эктахем» объединяет слайды и прибор, полностью механизированный и содержащий различные модули. Эта система позволяет проводить как единичные, так и серийные исследования в сыворотке крови. Вся процедура контролируется микропроцессором.


Vital
Diagnostics
ПРОИЗВОДСТВО НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ
ПРОИЗВОДСТВО НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ
для определения 30 параметров биологических жидкостей человека: липидов, субстратов, электролитов
ПОЛНАЯ ГОТОВНОСТЬ К РАБОТЕ
всех компонентов, исключающая дополнительную подготовку к анализу
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ПРОИЗВОДСТВЕ
западных и собственных наукоемких технологий
СТАБИЛЬНОСТЬ РАБОЧИХ РЕАГЕНТОВ
за счет использования высококачественного сырья производства фирм США, Германии, Англии
194156, Санкт-Петербург, пр. Энгельса, 27, а/я 33
тел./факс (812) 554 8132, 554 8324, 326 6198
E-mail: vital@med.fl.ru http://Vital.Diagnostics.fl.ru

ОЛЬВЕКС
ДИАГНОСТИКУМ

БИОХИМИЧЕСКИЕ НАБОРЫ ДЛЯ КДЛ
ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ
ПРОИЗВОДСТВО И РЕАЛИЗАЦИЯ

Биохимический анализатор

ROKI

Т. (812) 567-8446
Ф. (812) 567-8429

Россия, 193029,
Санкт-Петербург,
пр. Обуховской
обороны, 70, а/я 3
office@olvex.ru

www.olvex.ru

Образец (10 мкл) наносят на слайд, который помещают в прибор. Инкубация и измерение осуществляются автоматически в соответствии с программой. С помощью системы фирмы «Кодак» можно определить более 20 биохимических компонентов, в том числе электролиты, для последних используют специальные одноразовые слайды, состоящие из ионоселективной мембраны, эталонного слоя, содержащего насыщенный раствор электролита, слой хлорида серебра и проводник — серебряную пластинку.

Фирма «Ortho-Clinical Diagnostics France» компании «Johnson & Johnson», США, выпускает системы «VITROS», включающие прибор и многослойные пленки для экспресс-диагностики электролитов, ферментов, липидов и иммунодиагностических исследований в моче и сыворотке крови (рис. 7,8).

Слайды, основанные на колориметрических методах, состоят: из распределительного слоя, на который наносится проба, реакционного слоя, полупроницаемой мембраны, регистрирующего слоя, в котором образуется окрашенный продукт, и прозрачной подложки. В зависимости от метода и определяемого компонента слайды могут содержать и другие слои, снижающие интерференцию. Количественное определение субстратов проводится по двум промежуточным точкам или по конечной точке, активность рассчитывается из 54 измерений. Каждое измерение проверяется статистическим анализом для обеспечения точности. Фирма выпускает колориметрические слайды для определения амилазы, кальция, магния, креатинина, фосфора, глюкозы в моче; альбумина, билирубина, холесте-

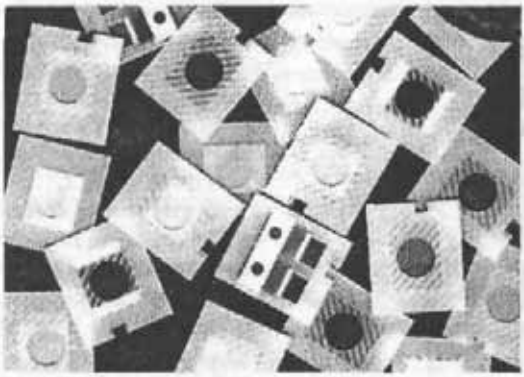


Рис. 7. Внешний вид многослойных аналитических элементов для " сухой химии" "Vitros" ("Johnson & Johnson").

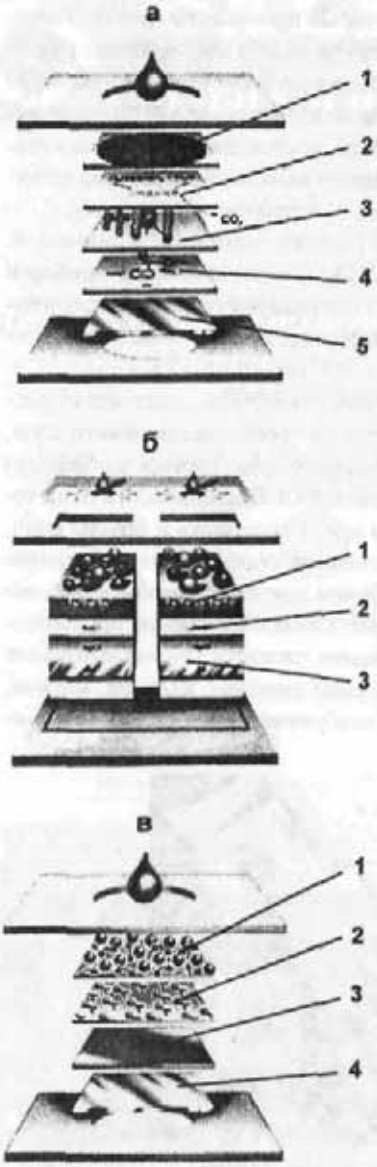


Рис. 8. Схема компоновки многослойных аналитических элементов (МАЭ)"Vitros" ("Johnson & Johnson").. а - колориметрический МАЭ : 1 - распределительный слой; 2 - реактивный слой; 3 - полупроницаемый слой; 4 - регистрирующий слой; 5 - прозрачный поддерживающий слой;
б - потенциометрический МАЭ: (два ионоселективных электрода соединены бумажным мостиком): 1 - ионоселективная мембрана; 2 - референсный слой; 3 - электрод Ag/AgCl;
в - *иммуноаналитический МАЭ (для* малых молекул - конкурентный иммунологический анализ; для больших молекул - неконкурентный иммунологический анализ): 1 - слой распределения микрошариков; 2 - рецепторный слой; 3 - гель; 4 - прозрачный поддерживающий слой.

рина, аммиака, алкоголя, лактата, салицилата, триглицеридов, ферментов (ХЭ, АлАТ, АсАТ, ЩФ, КФ, ЛДГ, липаза), лекарств, железа, лития и др.

Слайды, основанные на потенциометрии, включают ионоселективную мембрану, слой, пропитанный раствором хлорида натрия, два электрода Ag/AgCl. Концентрация ионов (Na^+, K^+, Cl^-) рассчитывается по разности потенциалов между двумя ячейками, на одну из которых наносят исследуемую пробу (мочу, сыворотку), а на другую — стандартный раствор с известной концентрацией ионов.

Третий тип слайдов — иммунослайды. Для количественного определения аналитов с низким молекулярным весом (дигоксин, фенитоин, фенобарбитал) используется иммуноферментный тест на основе конкуренции. Такой слайд содержит специфичное к аналиту моноклональное антитело, иммобилизованное на полимерных бусинках в рецепторном слое, и аналог исследуемому веществу с меткой — в распределительном слое. После протекания конкурентной реакции несвязанная метка отмывается специальным раствором, содержащим субстрат пероксидазы и вызывающим изменение окраски.

Для аналитов с большим молекулярным весом (например, С-реактивный белок) используют тест-систему типа «Сэндвич». Такой слайд содержит связывающий агент — антитело, и меченое антитело для определения связанного аналита.

Слайды поставляются в картриджах и могут храниться в холодной камере или морозильнике больше года, а в обычных условиях — от 1 до 5 недель.

Использование систем «VITROS» позволяет увеличить производительность, снижает интерференцию, уменьшает потребность в разведении и обеспечивает получение достоверных результатов.

Комбинации различных технологий «сухой химии» используются многими фирмами для производства систем для экспресс-диагностики в различных областях клинической химии.

В полностью автоматизированном анализаторе «Stratus» (фирма «American Dade», США) используется технология, представляющая собой комбинацию иммуноферментного, флюороиммунного анализов и кинетической энзимологии. В этой системе измеряется фронтальная поверхностная флюоресценция, и она предназначена для анализа лекарств и гормонов (T_3, T_4).

Тест-системы японской фирмы «Fuiji Photo Film» очень похожи на системы фирмы «Кодак», но они позволяют проводить определение мочевины, глюкозы, амилазы в цельной крови.

Фирмой «Ames», США, разработаны диагностические полоски для определения некоторых лекарств, основанные на принципе конкурентного связывания белков с использованием меченых флюорофорами субстратов и на иммунологической реактивности апоэнзимов.

Экспресс-тесты в виде диагностических полосок или имеющих формат «платформы», основанных на различных технологиях, выпускает фирма «Jant Pharmacal Corporation», США (тесты для определения и визуальной оценки беременности, hCG, холестерина, амфетамина, кокаина, опиатов, мемфетамина, бензодиазепина).

Финская фирма «ANIBIOTECH» выпускает иммунохроматографические тест-полоски «Biocard-Stick» для определения в сыворотке и моче hCG, LH и обнаружения рота- и аденовирусов в фекалиях. Схема устройства иммунохроматографической тест-кассеты представлена на рис. 9.

Швейцарская фирма «Morwelldiagnostic» выпускает средства экспресс диагностики для определения hCG, антистрептолизина-0, С-реактивного белка, мононуклеазы, ревматоидного фактора (латекс-тесты), карциоэмбрионального антигена, hCG, пролактина (принцип - иммуноферментный анализ), а также тесты для качественного визуального анализа гормонов, опухолевых маркеров, лекарств и для микробиологии.

Фирмой «Medisense» компании «Abbott» разработана новая генерация электрохимических тест-полосок «Sensor Electrodes Plus», предназначенных для использования с системой «Medisense Blood Glucose Systems».

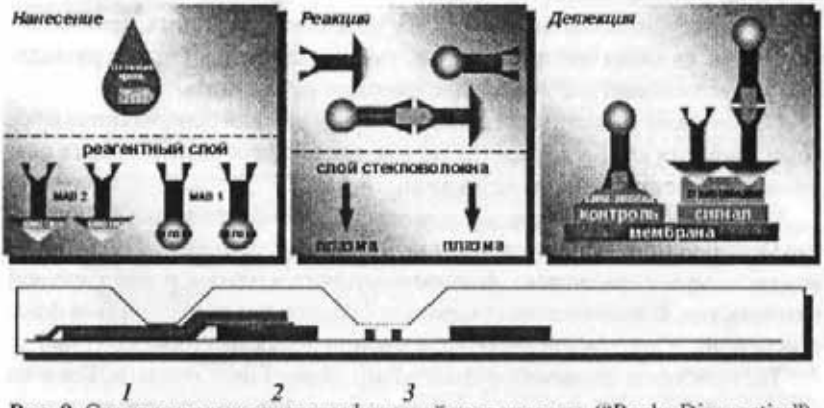


Рис. 9. Схема иммунохроматографической тест-кассеты ("Roche Diagnostics"). 1 - аппликационная зона; 2 - реакционная зона; 3 - зона детекции.

Глюкоза в образцах крови реагирует с глюкозооксидазой на тест-полоске и хлорным железом (Fe^{3+}). В результате протекающих реакций образуются электроны, которые от фермента передаются к электродам. Возникает слабый ток, сила которого пропорциональна содержанию глюкозы. Полоска содержит 3 электрода (референтный, активный и компенсирующий фон электрод). Тест-полоска покрыта пластиковой пленкой, создающей микросреду для реакционной зоны и защищает от повреждений и влияния окружающей среды. Каждая тест-полоска упакована в фольгу. Результат выдается через 20 с.

Эту систему рекомендуется использовать в педиатрии и контроле за содержанием глюкозы у больных инсулинзависимым диабетом.

Преимущества и недостатки систем «сухой химии» и их применения

Системы «сухой химии» являются гибким диагностическим средством для тех ситуаций, когда необходимо получение быстрых и надежных результатов (скорая помощь; у постели больного; полевые условия, профосмотры, скрининговые обследования, амбулаторные приемы и т. д.).

К их достоинствам относятся:

— быстрота и простота анализа;

— малый объем биожидкости, необходимый для анализа;

— возможность получения качественных и полуколичественных результатов без использования оборудования и высококвалифицированного персонала;

— возможность проведения анализа в цельной крови (во многих случаях);

— простота обслуживания приборов для количественного определения.

Недостатками систем «сухой химии» являются:

— довольно высокая стоимость анализа;

— зависимость выбора метода от производителя;

— возможность интерференции лекарств.

Основная часть стоимости приходится на дорогостоящую технологию, так как каждая партия требует калибровки, и специфическая информация для каждого носителя реактивов должна быть нанесена на магнитный код.

Развитие лабораторных тестов, основанных на использовании реактивов в сухом виде, продолжается в разных направлениях. Внедрение систем «сухой химии» в практику значительно расширяет возможность лабораторной диагностики.

Стандартные образцы

Общие понятия

В соответствии с ГОСТ «Стандартные образцы. Основные положения, порядок разработки, аттестации, утверждения, регистрации и применения» стандартный образец (СО) состава и свойств веществ и материалов — средство измерения в виде вещества (материала), состав и свойства которого установлены аттестацией. В зависимости от вида аттестуемой характеристики СО подразделяются на ***СО состава***, которые воспроизводят значения величин, характеризующих содержание определенных компонентов, и ***СО свойств***, которые воспроизводят значения величин, характеризующих физические, химические и другие свойства вещества, не относящиеся к составу.

В зависимости от сферы действия и области применения СО подразделяются на государственные (ГСО), отраслевые (ОСО) и СО предприятий.

СО предназначены для обеспечения единства и требуемой точности измерений и применяются для градуировки и поверки средств измерений, аттестации методик, контроля показателей точности, измерения физических величин, характеризующих состав и свойства материалов, методами сравнения.

В документации на СО (свидетельство, сертификат) нормируются следующие метрологические характеристики:

— аттестованное значение с указанием его погрешности в виде интервала допускаемого значения погрешности;

— характеристика однородности;

— характеристика стабильности (срок годности);

— функции влияния (зависимость от изменения внешних влияющих величин в заданных условиях применения).

Оценка аттестованного значения осуществляется методами, основанными:

— на использовании эталонов и образцовых средств измерения;

— на использовании аттестованных методик;

— на межлабораторной аттестации;

— на процедуре приготовления.

Референтные материалы

Понятию «стандартный образец состава» соответствует понятие «референтный материал» (РМ), используемое в зарубежной литературе. По определению Международной Организации по Стандартизации (ISO):

«референтный материал — это материал или вещество, одна или несколько характеристик которого являются в достаточной степени стабильными для использования при калибровке приборов, экспертной оценке метода измерения или аттестации материалов».

Понятию «аттестованный стандартный образец» соответствует понятие «сертифицированный референтный материал».

В качестве РМ (или СО) могут использоваться как стабильные простые по химической структуре, легко очищаемые вещества, так и сложные и разнообразные по составу (например, лиофилизированные смеси или их растворы в нативной матрице).

По терминологии Национального бюро стандартов (NBS) и Национального Комитета Клинических лабораторных стандартов (NCCLS) США референтные материалы делятся на:

— ***Первичные РМ*** — хорошо охарактеризованные, стабильные, гомогенные вещества, сертифицированные с наибольшей точностью с использованием наиболее точных методов и окончательных (абсолютных) методов (обычно национальными институтами стандартизации). Они используются для калибровки референтных методов, аттестации вторичных РМ.

— ***Вторичные РМ*** — аттестуются с помощью первичных РМ и используются для калибровки и стандартизации рабочих методов, а в сочетании с референтными или рабочими методами — для аттестации контрольных материалов.

Вторичные РМ обычно поставляются промышленными лабораториями и коммерческими организациями.

Высокоочищенные РМ обычно распространяются международными профессиональными обществами, институтами по стандартизации, национальными лабораториями. (Например, такими, как Национальный институт стандартизации США — NIST, Всемирная организация здравоохранения — WHO, Европейский Комитет по клиническим лабораторным стандартам — ECCLS и др.)

Стандартные образцы (СО) и Стандартные референтные материалы (SRM) могут использоваться как работниками клинико-диагностических лабораторий, так и производителями лабораторного оборудования и реагентов для клинической химии. Перечни СО отечественного производства и SRM, выпускаемых Национальным институтом стандартов и технологий (NIST) США для клинической химии, представлены в таблицах 2, 3, 4 и 5.

Таблица 2

Стандартные образцы для клинической химии, выпускаемые ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск.

№ по каталогу	Наименование СО	Краткое описание
В-8101	Билирубин-Ко-Ново	Комплект калибровочных образцов лиофилизированного неконъюгированного билирубина 4-х концентраций
В-8102	Новосо-К,Na-П- (для потенциометрии)	Комплект водных калибровочных образцов калия, натрия двух концентраций
В-8103	Новосо-К,Na-Ф- (для пламенной фотометрии)	Комплект водных калибровочных образцов калия, натрия 3-х концентраций
В-8104	Новосо-КР	Комплект водных калибровочных образцов креатинина 3-х концентраций
В-8105	Новосо-М	Комплект водных калибровочных образцов мочевины 3-х концентраций
В-8106	Новосо-CL	Комплект водных калибровочных образцов хлоридов 3-х концентраций
В-8107	Новосо-ХС	Комплект водных калибровочных образцов холестерина 3-х концентраций
В-8108	Новосо-ГЛ	Комплект водных калибровочных образцов глюкозы 3-х концентраций
В-8110	Новосо-Са	Комплект водных калибровочных образцов кальция 3-х концентраций
В-8113	Гемосо-Ново	Набор калибровочных растворов гемихрома с 4-мя концентрациями гемиглобина
В-8114	Новосо-МК	Комплект водных калибровочных образцов мочевой кислоты 3-х концентраций
В-8115	Новосо-Б	Комплект водных калибровочных образцов белка 3-х концентраций

Таблица 3

Стандартные референтные материалы (SRM), предназначенные для калибровки аппаратуры и аналитических методов, используемых в клинико-диагностических лабораториях.

SRM	Тип	Чистота %
910	Натрий пируват	98,7
911 в	Холестерин	99,8
912 а	Мочевина	99,9
913	Мочевая кислота	99,7
914 а	Креатинин	99,7
915 а	Кальций карбонат	99,9
916 а	Билирубин	98,3
917 а	d-Глюкоза (декстроза)	99,7
918 а	Калий хлорид	99,9817
919 а	Натрий хлорид	99,89
920	D-Маннитол	99,8
921	Кортизол (гидрокортизон)	98,9
924 а	Литий карбонат	99,9
925	4-гидрокси-3-метоксиминдальная кислота	99,4
928	Свинец нитрат	100
937	Железо металлическое (клиническое применение)	99,9
938	4-Нитрофенол	99,75
998	Ангиотензин I (человеческий)	94,1
2389	Аминокислоты в HC1 (17 аминокислот)	
1599	Противосудорожные препараты (вальпроевая к-та,карбамазепин)	

Таблица 4

Стандартные референтные материалы, приготовленные на основе крови, сыворотки и плазмы

SRM	Тип	Сертифицированные компоненты
909 в	Человеческая сыворотка (лиофилизированная)	Кальций, хлориды, холестерин, креатинин, литий, магний, калий, натрий, мочевина, мочевая кислота, общие глицериды
927 с	Бычий сывороточный альбумин	
956 а	Электролиты в замороженной человеческой сыворотке	Кальций, литий, магний, натрий, калий (по 3 уровня концентраций)
965	Глюкоза в замороженной человеческой сыворотке	3 уровня концентраций
368 в	Человеческая сыворотка, лиофилизированная	Ретинол, ретинил пальмитат, α-токоферол, транс-β-каротин, общие β- каротин и α-каротин, лютеин, холестерин (3 уровня концентраций)
195 а	Липиды в замороженной человеческой сыворотке	Холестерин, ЛВП и ЛНП, триглицериды (по 2 уровня концентраций)
955 в	Свинец в крови	

Для калибровки ион-селективных электродов выпускаются: растворы хлорида натрия (SRM 2201), хлорида калия (SRM 2203), фторида калия (2203) с известной ионной силой (ионной активностью), для калибровки спектрофотометров — стеклянные фильтры и растворы (для проверки оптических свойств приборов).

SRM 936a — хинин сульфат дигидрат — предназначен для оценки методов и калибровки флоресцентных спектрометров. Для калибровки и проверки поляриметрической аппаратуры выпускаются водные растворы сахарозы и декстрозы с сертифицированной величиной оптического вращения при трех длинах волн; для оценки сканирования и калибровки электронных микроскопов также выпускаются стандарты увеличения нескольких видов.

Применение стандартных образцов (СО) в клинической химии

Стандартные образцы выполняют различные функции в анализе. Они могут использоваться в качестве калибраторов с известным составом для мониторинга ежедневно выполняемых рутинных анализов, а также для

Таблица 5

Стандартные референтные материалы, приготовленные на основе мочи.

SRM	Тип	Сертифицированные компоненты
15076	Человеческая моча	Тетрагидроканнабинол-9-карбоксильная к-та
1508	-"-	Кокаин и метаболиты
1511	-"-	Комплекс наркотиков
2381	-"-	Морфин, кодеин
2382	-"-	Морфин глюкуронид
2670	-"-	Токсические металлы
2671 a	-"-	Фториды
2672 a	-"-	Ртуть
8444	-"-	Котинин

Для калибровки приборов и методов определения этанола в воздухе и крови выпускаются водно-спиртовые растворы четырех различных концентраций (SRM 1828a).

Для калибровки коммерческих pH-метров выпускаются SRM, *используемые* для приготовления растворов с известной активностью ионов водорода в области pH от 1 до 12. Например, SRMs 1861f (pH 6,86) и 18611f (pH 7,414).

контроля измерительной процедуры и сравнения результатов, выполняемых в различных лабораториях.

Следует отметить, что хотя требования, предъявляемые к калибратору и контрольному материалу, часто очень близки и один и тот же материал может быть потенциально пригоден для выполнения любой функции, ни один материал не может выполнять обе функции одновременно.

Применение СО (референтных материалов) в качестве калибраторов

Надежность аналитических измерений в значительной степени зависит от чистоты материалов, используемых для приготовления калибровочных растворов, точности их приготовления и процедуры калибровки.

Использование СО (РМ) в качестве калибровочных материалов обеспечивает сравнимость и точность измерений.

Большинство методов клинической химии являются методами сравнения, т. е. аналитический сигнал, полученный при измерении опытной пробы, сравнивают с сигналом от калибровочной пробы с известным

содержанием определяемого компонента. Для методов, основанных на реакциях, не протекающих полностью, строят калибровочные графики и определяют пределы линейности.

Возможны следующие типы калибровочных (аналог — «стандартных») растворов:

— Первичный калибровочный раствор — готовится из чистого вещества и чистого растворителя и аттестуется по процедуре приготовления. Такие растворы используются в референтных методах с высокой специфичностью, а также для аттестации вторичных калибровочных растворов методом сравнения.

— Вторичный стандартный раствор — концентрация компонента в нем устанавливается с помощью аналитических методов с известной точностью, т. е. аттестованными методами.

— Третичный стандартный раствор — это раствор с искусственной матрицей. Такие растворы готовят путем растворения чистого вещества и определенных добавок в подходящем растворителе в соответствии со специфическими свойствами исследуемого образца и аналитического метода.

Примером служит добавление детергента и некоторых ионов к калибратору для метода пламенной фотометрии.

— *Стандартный раствор, подобный исследуемому образцу.* Он представляет собой биологическую матрицу (например, сыворотку человека), содержащую те же самые основные компоненты, что и образец.

— Комбинированный стандарт — предназначен для определения нескольких компонентов. Например, калибраторы для проточных анализаторов.

— Арбитражный стандарт — калибратор, содержащий неизвестное количество специфического вещества. Аттестуется по согласованию. К ним относятся международные биологические стандарты, стандарты иммуноглобулинов.

— Внутренний стандарт — вещество, которое не присутствует в исследуемом образце и которое добавляется в известном количестве к образцу *или к образцу и калибратору с целью коррекции результатов.* Примером могут служить калибраторы для метода газовой хроматографии; добавка лития к разбавителю в пламенной фотометрии.

Требования к калибровочным растворам:

1. Соответствие используемому методу и близость состава к составу исследуемого образца.

На результаты анализа влияет среда (матрица), в которой находится данный компонент. «Химический матричный эффект» возникает из-за

неспецифичности метода и интерференции различных веществ, присутствующих в матрице. «Физический матричный эффект» возникает из-за различной вязкости или поверхностного натяжения образца и калибровочного раствора (например, в методах атомно-абсорбционной спектроскопии, пламенной фотометрии).

2. Стабильность, зависящая от природы вещества и условий хранения. При использовании стабилизирующих добавок необходимо знать их влияние на результаты анализа.

3. Характеристика погрешности аттестованного значения содержания компонента. Доверительные интервалы для калибраторов зависят от цели, для которой используется аналитический метод.

Ферментные референтные материалы

Применение калибровочных растворов ферментов в области энзимологии является в настоящее время предметом научных исследований, проводимых различными международными организациями. Сложность проблемы заключается в том, что при анализе ферментов определяется не их концентрация, а каталитическая активность, зависящая от условий определения (вида и количества субстрата, буфера, pH среды, температуры) и соотношения изоферментов.

Для изучения свойств ферментов, калибровки методов, приготовления контрольных сывороток методом добавок, а также для разработки новых методов необходимы препараты чистых ферментов, отвечающих требованиям, предъявляемым к референтным материалам.

Одно из основных требований — стабильность в течение определенного периода. В настоящее время разработаны препараты большинства диагностически значимых ферментов, которые при определенных условиях хранения стабильны длительное время. Например, лишь незначительное падение активности в течение года наблюдается даже для такого лабильного энзима, как простатическая кислая фосфатаза. Разработаны референтные материалы ЛДГ из эритроцитов, липазы из печени свиньи, АсАТ из эритроцитов, гамма-ГТ из почек свиньи и др.

При исследовании ферментных референтных материалов возникает такая проблема, как зависимость значения каталитической активности от метода аттестации.

При проведении внутри- и межлабораторного контроля качества при сравнении результатов также учитывается метод определения ферментов.

Наибольшая сложность возникает при сравнении результатов, полученных различными методами. Эту проблему пытались решить путем достижения консенсуса в принятии на международном уровне стандартных рутинных методов. Однако использование одного универсального метода для измерения активности данного фермента невозможно даже в пределах одной страны, главным образом из-за постоянных технологических усовершенствований, использования различных субстратов, технологий «сухой химии».

Использование в качестве калибраторов ферментных референтных материалов с установленной стабильностью и определенной с помощью референтного метода каталитической активностью позволяет получить значение активности в образцах сыворотки пациентов в «единицах референтного метода», даже если они анализируются другим методом, более подходящим для данной лаборатории. Это открывает путь для сравнения результатов анализа ферментов различными методами, полученными в лабораториях, участвующих в Программе внешнего контроля качества.

После выбора калибратора и методов необходимо экспериментально подтвердить наличие связи между методами, т. е. определить наличие идентичного и постоянного числового соотношения, с учетом пределов экспериментальных ошибок, между результатами, полученными двумя методами, включая как калибратор, так и образцы сывороток пациентов. Другими словами, численное отношение активностей, определенных референтным и выбранным рутинным методом, для калибратора должно быть таким же, как средние отношения активностей, полученных этими методами, в сыворотках пациентов (рекомендуется использовать 50—100 образцов сыворотки в широком диапазоне активностей).

Требования к ферментным «калибраторам»:

— Выбранные рутинный и референтный методы должны быть идентичны, или, по крайней мере, подобны по специфичности к исследуемому компоненту (одинаковая селективность по отношению к изоферментам и изоформам).

Например, нельзя ожидать связи между определениями активности кислой фосфатазы в сыворотке, имеющими различную селективность по отношению к простатическому и непростатическому изоферментам.

— Свойства ферментного калибратора должны быть подобны, по возможности, свойствам исследуемого фермента в его натуральной матрице, т. е. сыворотке или плазме.

Для приготовления таких калибраторов используют метод добавки требуемых изоферментов и ферментов к пулу человеческой сыворотки или плазмы. На практике получение и использование ферментов человека ограничивается этическими и гигиеническими соображениями.

Ферменты животного происхождения или полученные методами генной инженерии могут близко имитировать свойства их человеческого аналога. Так как содержание белка и ионный состав, по-видимому, являются наиболее важными характеристиками ферментсодержащей матрицы, использование ферментов нечеловеческого происхождения во многих случаях допустимо (например, гамма-ГТ из почек свиньи). С помощью калибратора из этого фермента была подтверждена связь между двумя методами определения активности гамма-ГТ (метод МФКХ и метод, рекомендованный Скандинавским обществом клинической химии).

Стандартные калибровочные материалы для коагулологических методов

Стандартизация этих материалов представляет значительные трудности из-за их сложного состава и различных источников получения.

Такие стандартизованные на международном уровне препараты (например, тромбин, плазмин, тромбопластин и др.) разрабатываются и аттестуются различными национальными и коллегиальными организациями под эгидой ВОЗ, такими, как Международный комитет по тромбозам и гемостазу, Международный комитет по стандартизации в гематологии и др. (МС — международные стандарты, МРП — международные референтные препараты).

Порядок стандартизации биологических препаратов: национальные стандартные препараты калибруют против международных, местные — против национальных (если они есть) или международных, исследуемые пробы — против местного или национального стандарта.

Использование референтных материалов для оценки качества аналитических методов

Клинические референтные материалы используются для оценки аналитической надежности методов (правильности, специфичности, воспроизводимости, чувствительности, линейности, референтных пределов).

Правильность — оценка правильности результатов представляет наибольшую сложность, так как требуется референтный материал с матрицей, идентичной исследуемому образцу (сыворотке, плазме и т. д.), т. е. нативный материал со значениями, установленными референтными ме-

тодами. В настоящее время референтные методы разработаны далеко не для всех компонентов сыворотки, поэтому создание сертифицированного референтного материала человеческой сыворотки зависит от развития соответствующих референтных аналитических методов.

Для электролитов, которые определяются прямым методом спектрометрии с изотопным разведением разработаны как референтные методы, так и референтные материалы (SRM для калия, натрия, магния, кальция, лития, хлора).

Специфичность — способность процедуры измерения определять исключительно измеряемое вещество. Для ее определения рекомендуется использовать нативный материал со значениями, установленными референтными методами, а также нативные материалы с добавлением интерферирующих веществ, предположительно присутствующих в исследуемых образцах и дающих перекрестные реакции, влияющие на результаты. Например, при иммунологических методах определения кортизола возможно присутствие в сыворотке таких кросс-реагентов, как альдостерон, кортизон, кортикостерон и др. Другие вещества-интерференты, как гемоглобин, билирубин, белки, липиды, а также добавленные к пробе гепарин, ЭДТА и др., не вызывают специфического аналитического сигнала, но приводят к увеличению или уменьшению величины сигнала.

Для выявления интерференции используют метод добавок чистых веществ к пробам. Референтные материалы, используемые для оценки специфичности, должны быть хорошо аттестованы не только на содержание определяемого компонента, но и на содержание интерферентов.

Воспроизводимость — для ее оценки можно использовать сливной нативный материал.

Чувствительность — для ее определения рекомендуется использовать нативный материал с значениями, установленными референтными методами.

Линейность устанавливается по результатам предыдущих измерений.

Референтные пределы устанавливаются с помощью сывороток, взятых у референтного контингента.

Оценка аналитической надежности метода и полная его характеристика являются обязанностью производителя наборов и разработчика, которые должны обладать всеми необходимыми референтными материалами и референтными методами. В рутинных лабораториях оценка метода производится только тогда, когда используется самостоятельно разработанный метод. Лаборатория должна располагать только средствами

для подтверждения заявленного производителем качества метода, которое осуществляется через систему контроля качества.

Стандартные образцы (СО) для контроля качества (контрольные материалы)

СО состава, предназначенные для контроля качества (по зарубежной терминологии «Контрольные материалы, контрольные сыворотки»), должны соответствовать трем основным требованиям:

— быть подобными, по возможности, исследуемому материалу;

— сохранять стабильность, в том числе и после растворения, в течение определенного периода хранения;

— межфлаконная вариация в концентрациях компонентов должна быть незначительной по сравнению с погрешностью анализа.

Типы контрольных материалов

1. Лиофилизированные контрольные материалы

Они обычно готовятся из большого пула человеческих или животных сывороток и обогащаются различными компонентами для достижения желаемой концентрации в конечном материале. Пул разливается во флаконы и лиофилизируется или вымораживается. Все процессы приготовления должны быть стандартизованы.

Важнейшие требования:

— гомогенность (межфлаконная вариация менее 1%);

— стабильность (желательно не менее года при хранении при температуре +4°С, а после растворения — в течение 2 дней);

— мутность растворенного материала, возникающая из-за денатурированных липопротеидов не должна превышать 0,35—0,45 единиц экстинкции при длине волны 630—690 нм и длине оптического пути 0,3 см.

Сходство контрольных материалов, приготовленных из сывороток животных, с сывороткой человека по большинству параметров в основном удовлетворительное. Однако в случае контроля качества результатов исследования белков (трансферрина, иммуноглобулинов, электрофореза белков) необходимо использовать контрольные материалы на основе человеческой сыворотки, так как наблюдается большое различие белковых соединений человека и животных.

Жидкие контрольные материалы

Эти материалы готовят на основе пулов сывороток с применением метода добавок. Для повышения стабильности используют различные стабилизаторы, например, глицерин, этиленгликоль и др.

Преимуществами жидких контрольных материалов являются гомогенность, прозрачность и удобство применения.

С другой стороны, следует отметить, что добавление стабилизаторов в значительных количествах изменяет матрицу, и сходства с образцами сывороток пациентов не наблюдается в таких аналитических процедурах, как проточный анализ.

Другой недостаток — необходимость хранения при более низкой температуре (-20°С) и чувствительность к изменению температуры.

Альтернативу коммерческим контрольным материалам представляют приготовленные непосредственно в лаборатории контрольные материалы — сливные сыворотки.

При их использовании возникают проблемы нестабильности, интерференции и опасность инфицирования.

Для контроля правильности и точности используются контрольные материалы с известными значениями содержащихся в них компонентов.

Аттестованные значения содержания компонентов в контрольных материалах устанавливают различными способами:

— взвешиванием чистого добавляемого в сыворотку компонента;

— межлабораторной аттестацией с использованием одного и того же метода и после исключения ошибок;

— референтными лабораториями с использованием референтных или аттестованных рутинных методов (методов с установленной погрешностью).

В настоящее время используются все три способа с их преимуществами и недостатками.

Метод взвешивания применим только к низкомолекулярным компонентам, при этом добавленный компонент должен быть удален из матрицы полностью.

Наиболее приемлемый способ — использование референтных методов в референтных лабораториях. Это метод выбора в будущем. В настоящее время в связи с отсутствием референтных методов для многих компонентов сыворотки аттестация выполняется с помощью лучших рутинных методов с известной погрешностью.

Коммерческие контрольные материалы для контроля качества различных биожидкостей с аттестованными значениями содержания компонентов в нормальной, пограничной и патологической области с указанием метода, для контроля которого они предназначены, выпускаются различными зарубежными изготовителями.

Литература

1.ГОСТ 3885-73 (И 1 – 79; И 2 – 80; И 3- 83; И 4 – 89; И 5 – 92) «Реактивы и особо чистые вещества. Правила приема, отбор проб, фасовка, упаковка и маркировка»

2.ГОСТ 8 – 315 91. «Стандартные образцы. Основные положения, порядок разработки, аттестации, утверждения, регистрации и применения»

3.Меньшиков В.В., Самецкая Н.Б. // Принципы и применение систем «сухой химии». // В кн. «Современные проблемы развития лабораторной диагностики»// М., 1987, стр. 3-7

4. Самецкая Н.Б. // Требования к калибровочным материалам// В кн. «Унификация лабораторных методов исследования» // М. 1988, стр. 46-57

5.Самецкая Н.Б., Добрянская Л.Д. // Применение калибровочных материалов для исследования содержания различных компонентов в биологических жидкостях // В кн. «Унификация клинических лабораторных методов исследования»// М., 1988, стр. 71-75

6. Карпищенко А.И., Антонов В.Г. и др.// Методы клинической биохимии. Анализаторы «сухой химии» // В кн. «Медицинские лабораторные технологии. Справочник". Т. 2 //СПб, 1999, стр. 155-158

7. Methods of Enzymatic Analysis. III-rd edition. Vol. II// Weinheim, 1983, pp. 2-431

8.Reflometry. Possibilities and Limitations of "Dry Chemistry". Lectures and Discussions. Medical Congress // Dusseldorf, 1983

ОСНОВНЫЕ АНАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ И ОБОРУДОВАНИЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

I. КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ АНАЛИТИКА КАК ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ АРСЕНАЛ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ

Объектом изучения лабораторной медицины является биологическая жидкость или другой биологический материал, проба которого изъята из организма для того, чтобы изучить ее состав и определить, не изменен ли он по сравнению с нормой. Исследования, которые требуется провести при этом, столь же сложны, как и сам состав биологического материала.

Исследовательский арсенал лабораторной медицины складывался постепенно: от простейших органолептических методов оценки физических качеств биологических жидкостей самими врачами к аналитическим технологиям, все более глубоко проникающим в многокомпонентный состав и природу взаимодействия отдельных компонентов материалов и требующим специальных профессиональных знаний, умений, технического оснащения. Этот процесс шел на стыке сложного взаимопроникновения развивающихся фундаментальных наук - физики, химии, биологии - и клинической медицины, имевшей поначалу сугубо эмпирический характер, т.е. основанной на наблюдениях врачевателей.

Первые исследовательские приемы в отношении биожидкостей были описаны в древних трактатах китайской и индийской медицины, а затем в наблюдениях Гиппократа и Авиценны. Оценивался цвет мочи, а при тех состояниях, которые впоследствии были распознаны как сахарный диабет, и вкус мочи (рис. 1). Состояние жидкостей в организме было даже положено в основу теоретических концепций «гуморальной патологии», бытовавшей в древнегреческой медицине.

Рис. 1. Репродукция картины J. Toorenvliet «Визит врача». Конец XVII века. (Из коллекции Музея изобразительного искусства, Будапешт, Венгрия).

Новый этап в развитии лабораторных технологий был положен Левенгуком, который с помощью изобретенного им оптического устройства, получившего название «микроскоп», оказался способен наблюдать микроорганизмы и клетки человеческой крови (рис. 2). Полуфантастический период средневекового увлечения алхимией (рис. 3) стал в определенной мере платформой для последующего возникновения и развития серьезных химических представлений, которые Парацельс воспринял для медицины, а это, в свою очередь, послужило М.В.Ломоносову основанием для его знаменитого постулата: «Врач без довольного знания химии совершен быть не может». Химические знания, приложенные к познанию процессов в организме человека, стали фундаментом биохимии человека или медицинской (клинической) биохимии.

Рис. 2. Микроскоп, сделанный из дерева. С помощью такого микроскопа Anton van Leeuwenhook (1632-1723) в 1683 г. впервые *наблюдал микроорганизмы и клетки крови.* (Из коллекции Музея истории медицины им. Земмельвейса, Будапешт, Венгрия)

Микроскоп и химическая колба впоследствии были избраны символами лабораторной профессии.

Одним из основоположников клинической химии по-видимому можно считать Бойля, который в 1684 г. опубликовал статью об исследовании крови человека. Вслед за тем Лангриш описал изменения крови больных с лихорадкой. Изобретение Дюбоском и Гоппе-Зейлером в начале XIX века первых исследовательских приборов для физиологической и патологической химии положило начало широкому исследованию химического состава биологических жидкостей человека в интересах диагностики патологических состояний. С тех пор оснащение исследований биологических жидкостей человека с помощью различных приборов стало мощным средством восприятия лабораторной медициной достижений физики и ее прикладных отраслей по мере их открытия и изобретения. Как об этом можно судить по появлению в конце 30-х - начале 40-х годов XIX века руководств и периодических изданий по химическим и микроскопичес-

Рис. 3. Лаборатория средневекового алхимика XV - XVI века. (Из Музея испанской фармации, Мадрид).

ким исследованиям при патологии человека, это время явилось периодом становления клинической лабораторной диагностики.

Наблюдения Пастера, Коха, Листера стали исходным пунктом для формирования клинической микробиологии, т.е. науки о микроорганизмах, которые могут быть причиной патологических состояний организма человека. И.И.Мечников гениально оценил наблюдавшийся им факт скопления лейкоцитов вокруг места повреждения ткани как проявление механизма защиты организма, что заложило основы современной иммунологии.

Таким образом, к концу XIX века сложился тот круг наук и присущих им исследовательских приемов, которые на протяжении XX века бурно развивались и ширились, обретая очертания современной лабораторной медицины.

Объектами исследований, проводимых в клинической лаборатории, служат образцы биологических материалов, взятых у обследуемых па-

циентов: крови, мочи, спинно-мозговой жидкости, слюны, пота, семенной, плевральной, перикардиальной, асцитической, синовиальной жидкости, соскобы со слизистых оболочек, пунктаты и биоптаты тканей различных органов. В этих образцах современная клиническая лаборатория способна определять наличие и количественное содержание обширного круга эндогенных и экзогенных компонентов:

- собственных ***клеточных элементов организма*** обследуемого - клеток крови, клеток тканей;

- ***эндогенных химических компонентов*** метаболических процессов в организме - субстратов, метаболитов, ферментов, коферментов, различных регуляторных веществ;

- ***биологических факторов распознавания, защиты и аутоагрессии*** - антигенов, антител, цитокинов;

- ***носителей генетической информации*** - молекул нуклеиновых кислот, определенных последовательностей нуклеотидов, генов;

-***экзогенных химических компонентов*** - токсинов, спиртов, металлов, следовых элементов, лекарств;

-***экзогенных организмов*** - бактерий, вирусов, грибков, паразитарных организмов в разных стадиях их жизненного цикла.

Наряду с отдельными компонентами, клиническая лаборатория изучает и их сочетания и взаимоотношения, что дает представление о деятельности определенных физиологических механизмов и систем, среди которых системы метаболизма различных классов органических и минеральных веществ, система кроветворения, свертывающая и противосвертывающая системы, системы антигенов гистосовместимости и дифференцировки, система иммунной защиты, системы нервной, гуморальной и нейро-гуморальной регуляции.

В настоящее время в поле зрения лабораторной медицины находится несколько тысяч компонентов биологических материалов, исследование которых представляет интерес для диагностики тех или иных форм патологии человека.

На основе заимствованных из фундаментальных наук представлений и знаний в рамках лабораторной медицины сложились довольно хорошо очерченные субдисциплины:

- ***клиническая биохимия;***

- ***клиническая лабораторная иммунология (с аллергологией);***

- ***клиническая лабораторная гематология (включая гемоцитологию и коагулологию);***

- клиническая цитология (эксфолиативная и пункционная);

- клиническая молекулярная биология с лабораторной диагностической генетикой;

- клиническая лабораторная паразитология;

- клиническая микробиология (включая бактериологию, вирусологию и микологию);

- клиническая лабораторная токсикология;

- лабораторный фармакокинетический контроль (мониторинг) лекарственной терапии.

Собственно говоря, каждая из лабораторных субдисциплин является мостиком от соответствующей медико-биологической науки к практике лабораторного дела.

В содержании любой субдисциплины можно выделить три основных раздела. Это своего рода опоры каждого из мостов от теории к клинической лабораторной практике. Первый из них представляет собой комплекс знаний о биологической и химической природе, основных свойствах, месте в организме человека, структурных и функциональных особенностях, роли в процессах жизнедеятельности и патологических процессах, закономерной связи тех или иных аналитов с определенными патологическими состояниями. Это - ***клиническая патобиология***. Понятно, что столь разнородные по биологической и химической природе компоненты требуют для своей детекции и количественного измерения достаточно обширного арсенала аналитических способов и средств. Аналитические возможности современной клинической лаборатории опираются на широкий круг физических, химических, биологических приемов, а также на применение разнообразных препаративных и аналитических (в том числе, автоматических) устройств. Комплекс знаний и умений, позволяющих с требуемой точностью осуществлять детекцию и количественное измерение соответствующих компонентов (аналитов) в биологических материалах человека, представляет собой ***клиническую лабораторную аналитику***.

Интеграция знаний и умений, позволяющих использовать обнаружение и определение тех или иных аналитов для получения информации о состоянии организма обследуемого пациента и выявления у него отклонений от нормы, о наличии или отсутствии предполагаемого клиницистом патологического процесса, о течении болезни и эффективности проводимого лечения, составляет существо ***клинической лабораторной диагностики***. Этот раздел лабораторных субдисциплин находится

в особенно тесной связи с постоянно развивающейся сферой клинической медицины в целом и отдельных ее областей - клинической диагностикой, являясь для нее важным источником ценной объективной информации о пациенте.

Таким образом, лабораторная медицина представляет собой общую прикладную сферу ряда медико-биологических наук, питаемую их теоретическими и методическими достижениями и претворяющую их исследовательский потенциал в практически применимую в клинике информацию о конкретном пациенте в его конкретном состоянии.

Современный технологический арсенал лабораторной медицины складывался постепенно как отражение общего прогресса исследовательских возможностей науки: от общего к все более частному, от поверхностного к все более глубокому проникновению в процессы, происходящие в организме. Это можно проследить на примере развития аналитических возможностей клинической химии за последнее столетие (табл. 1).

Таблица 1.

Разработка и чувствительность аналитических процедур в клинической химии за последние 100 лет (по Гудер, Бюттнер, 1997).

Время внедрения	Чувствительность	Метод исследования
1890		гравиметрия титрометрия
	ммоль/л	фотометрия нефелометрия
1940		хроматография
	мкмоль/л	флюорометрия атомная абсорбция
1960		радиоиммуноанализ
	нмоль/л	иммуноферментный анализ флюоресцентный иммуноанализ биолюминесценция
1980	пмоль/л	люминесцентный иммуноанализ полимеразная цепная реакция

Можно с уверенностью сказать, что сегодняшний уровень аналитических возможностей лабораторной медицины завтра будет превзойден. В лабораториях ученых, в конструкторских бюро аналитической аппаратуры контуры завтрашнего облика клинической лабораторной диагностики вырисовываются все более отчетливо.

На чем же основан этот прогресс? Он имеет основные точки опоры в трех фундаментальных науках - физике, химии и биологии. Жизнь как форма движения материи более сложна по отношению к физической и химической ее формам, но она включает в себя элементы неживой материи, и поэтому при познании явлений жизни и изучении биологических объектов использование физических и химических знаний и методов исследования так же необходимо, как и собственно биологических знаний и методов.

Уже давно подмечено, что наибольших успехов можно ожидать на стыках наук. Современные лабораторные аналитические технологии сложились на основе сочетанного использования физических, химических и биологических свойств исследуемых компонентов биоматериалов и соответствующих способов их оценки и измерения.

Биологический материал, биологическая жидкость представляют собой сложную многокомпонентную смесь веществ и клеток различного состава и строения, играющих ту или иную роль в жизнедеятельности организма и, следовательно, способных отразить нарушения определенных метаболических процессов, быть маркерами патологии. Физико-химической сущностью современных аналитических методов является использование взаимодействия физических факторов и химических веществ с клеточными элементами и молекулами для их идентификации и количественного измерения, наряду с физико-биологическими методами, использующими для тех же целей физические методы в сочетании с биологическими свойствами специфических реагентов (ферментов, цитокинов, рецепторов, антигенов, антител).

Поскольку целью исследования является обнаружение и количественное определение того или иного вещества или клетки, **аналитические задачи состоят в разделении биологической смеси, выделении из нее интересующего исследователя компонента (аналита) и его детекции или измерении его количества.**

II. МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ БИОМАТЕРИАЛОВ

Соединения, обладающие разной степенью сложности и молекулярной массой, участвующие в процессах метаболизма, находятся большей частью растворенными в водной фазе, т. е. ионизированными или гидратированными. Их разделение может быть осуществлено различными способами, опирающимися на физические или химические их свойства. В процессе исследования биоматериалов может потребоваться отделение клеток и других корпускулярных компонентов от остальной биожидкости.

Большинство из этих приемов относится к менее точным методам исследования, однако применяемые в современной клинической аналитике способы разделения в результате использования достижений технического прогресса приобрели довольно высокие препаративные и отчасти исследовательские возможности. В их числе: **экстрагирование, фильтрование, центрифугирование, электрофорез, хроматография.**

Методы разделения смеси веществ позволяют решать лишь часть аналитических задач клинической лабораторной диагностики, в частности, выделение определенных веществ из биологического материала, их идентификацию, и поэтому по большей части они выступают как первый этап аналитической технологии, за которым следует количественная оценка, т.е. измерение количества выделенного из смеси вещества или группы родственных веществ. Эту роль выполняют **оптические, электрохимические и радиометрические методы.** Устройства для выполнения этих процедур могут входить в качестве компонентов в современные системы для электрофореза и хроматографии.

Экстракцией называется процесс разделения веществ, основанный на их различной растворимости в разных растворителях. Экстрация применяется обычно для очистки или для концентрирования изучаемого вещества.

В качестве растворителя обычно избирают раствор, который легко испаряется и не образует эмульсии. Эмульгирование мешает экстракции и требует дополнительных, а потому нежелательных, процедур (добавления солей, детергентов, охлаждения, отстаивания и т. п.). Для проведения экстрагирования используют сосуды с краном в нижней суженной части. После тщательного встряхивания смеси растворов и достижения равновесия нижний слой выпускают через кран.

При разделении водорастворимого и водонерастворимого веществ используют бумагу, импрегнированную силиконом, которая является гидрофобной. Органический растворитель свободно проходит через бумажный конус, а водный слой остается.

Выпаривание избытка растворителя осуществляется обычно с применением пропускания потока воздуха над поверхностью растворителя и нагревания.

Другим приемом, в частности, при изготовлении контрольных материалов, служит замораживанием под вакуумом (охлаждение до -40°С и резкое понижение давления).

Фильтрование применяется для отделения частиц от жидкости. В повседневной лабораторной практике используется *поверхностное фильтрование* с помощью фильтровальной бумаги или мембран. Частицы остаются на поверхности фильтра, если их размер превышает размер диаметра пор. Глубокое фильтрование осуществляется через относительно толстый слой фильтрующего материала - хлопка, стекловолокна, асбеста, диатомической земли и т. п., причем частицы задерживаются как на поверхности, так и в глубине мембраны.

Фильтрование может происходить с обычной скоростью протекания жидкости через фильтр под влиянием силы тяжести. В этих условиях на скорость фильтрации влияет характер фильтрующего материала, площадь его поверхности, размер пор, а также число и размер частиц в растворе и pH раствора. Различные виды фильтровальной бумаги градуируются по толщине слоя, устойчивости к нагрузке, размеру задерживаемых частиц. Скорость фильтрации может быть увеличена с помощью вакуума. При этом действие силы тяжести складывается с силой всасывания. Для вакуумной фильтрации применяются фильтры с повышенной прочностью, в том числе из стекловолокнистой бумаги.

Мембранные фильтры с точно заданным размером пор изготавливаются из гомогенных полимерных материалов - ацетата, нитрата или эфиров целлюлозы, поливинилхлорида, политетрафторэтилена, поливинилиден фторида - выбор которых зависит от цели применения фильтра. Наиболее широко распространены мембраны на основе целлюлозы. Они изготавливаются величиной до 30 см в диаметре с размером пор от 10 до 0,025 мкм, причем мембраны с наиболее узкими порами применяются для стерилизации жидкости, так как задерживают микроорганизмы. Площадь пор составляет до 80% поверхности мембраны, что обеспечивает высокую скорость фильтрации при любом диаметре пор. Материал мем-

браны обычно гидрофобный, однако, при необходимости ему может быть химическим путем придана гидрофильность. Мембраны используются в условиях действия одной лишь силы тяжести, при положительном давлении, а также при воздействии вакуума.

Одним из вариантов фильтрования, применяемым для повышения концентрации макромолекул (например, белков), является *ультрафильтрация* через фильтры с чрезвычайно узкими порами, через которые проходят молекулы небольшого размера. Фильтрование может использоваться в сочетании с центрифугированием. Конусообразные фильтры из ацетата целлюлозы помещаются в центрифужные пробирки. При центрифугировании через фильтры проходят жидкость и молекулы с молекулярной массой меньше 50000. Таким способом может быть повышена концентрация белков в моче или спинномозговой жидкости для последующего их электрофоретического разделения.

Центрифугированием называется разделение компонентов биоматериалов, отличающихся по своей массе, путем приложения к ним ускорения силы тяжести в специальных препаративных приборах - центрифугах.

В клинических лабораториях этот способ применяется для отделения клеток крови от плазмы или сыворотки, для концентрирования клеточных и других компонентов биожидкости для последующей микроскопии; для удаления преципитировавших белков из пробы; для отделения комплексов белок-лиганд от свободных лигандов; для разделения двух жидких фаз, обладающих различной плотностью (например, липидов от плазмы или сыворотки).

Сила, воздействующая на биоматериал в центрифуге и выраженная в величине ускорения силы тяжести (g), помноженной на некий коэффициент, зависит от скорости вращения ее ротора и расстояния от центральной оси до сосудов, расположенных по периферии ротора, в которых содержится биоматериал. Для расчета этой силы, носящей название «относительная сила центрифугирования» (relative centrifuge force, RCF), применяется следующая формула:

$RCF = 1{,}118 \times 10^{-5} \times r \times n^2$, где

$1{,}118 \times 10^{-5}$ - эмпирически полученный коэффициент

r - радиус вращения сосуда с биоматериалом в сантиметрах, т. е. расстояние от центра ротора до дна сосуда

n - скорость вращения ротора в числе оборотов в минуту.

Величина RCF может также быть выведена по номограмме (рис. 4).

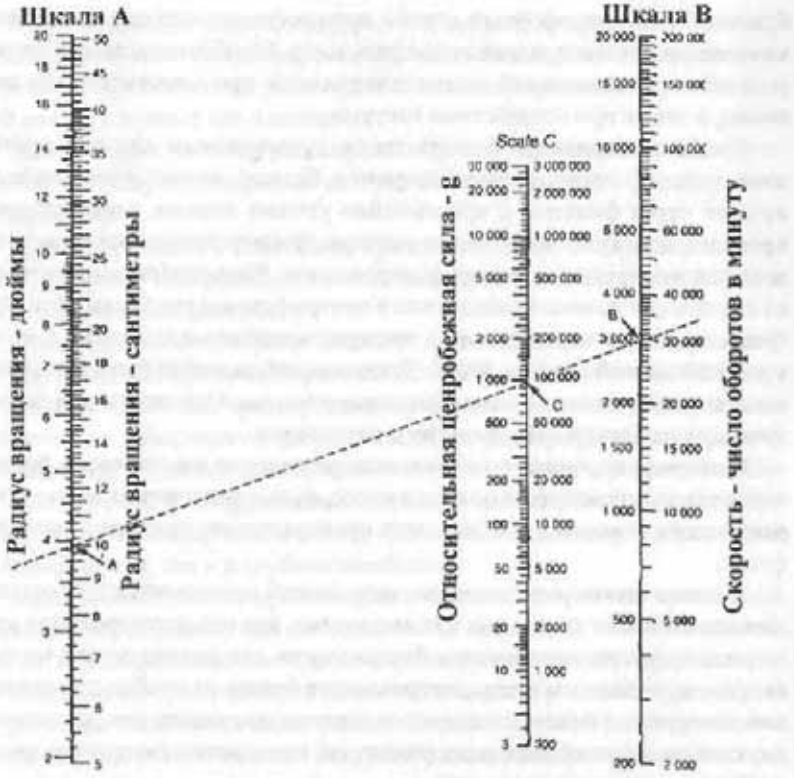


Рис. 4. Номограмма для расчета относитель ной центрифужной силы (RCF). (По N.W.Tietz, ed. «Textbook of Clinical Chemistry», 1986)

В центрифуге горизонтального типа расстояние r обычно больше, чем в центрифугах углового типа, поскольку сосуды в такой центрифуге не могут принять горизонтальное положение.

Время центрифугирования для полного отделения частиц от жидкой фазы зависит от скорости вращения, радиуса ротора и того расстояния, которое частицы должны пройти до дна сосуда (т. е. от высоты столба жидкости в сосуде). Часто рекомендуют при RCF равной 1000-1200 x g центрифугировать 10±5 мин. Современные скоростные многоцелевые центрифуги, управляемые микропроцессорами, позволяют значительно ускорить процесс пробоподготовки (табл. 2) (Рис. 5).

Таблица 2

Рабочие характеристики центрифуги StatSpin MP (IRIS)

Виды исследований	Объем пробы	rpm / rcf	Длительность цикла
Клиническая химия			
- плазма	0,1 - 3,0 мл	20000 / 11200 15800 / 12000	30 сек
- преципитация ЛВП	0,05 или 0,5 мл	15800 / 12000	95 сек
- липемические пробы	*0,5 или 1,5 мл*	*15800 / 12000*	95 сек
- моча (токсикология)	1,5 мл	15800 / 12000	30 сек
Гематология			
- бедная тромбоцитами кровь	0,5 - 3,0 мл	20000 - 11200	120 сек
- гематокрит	9 мкл	20000 / 11200	120 сек
Анализ мочи			
- осадок мочи	1,5 мл	9800 / 3900	45 сек

Рис. 5. Многоцелевая настольная высокоскоростная центрифуга StatSpin MP (IRIS Company).

С учетом применения иммунохимических и молекулярно-биологических методов исследования центрифуги могут оснащаться специальными роторами для стрипов.

Чтобы обеспечить безопасное центрифугирование, следует использовать сосуды, заведомо выдерживающие воздействие приложенной силы тяжести. Размер сосуда (пробирки) должен позволять ей свободно принимать горизонтальное положение. Особенно тщательным должно быть соблюдение балансировки ротора, для чего он должен загружаться симметрично расположенными и заполненными по возможности равными объемами жидкости пробирками. Для предупреждения распыления части пробы биожидкости при центрифугировании пробирки рекомендуется помещать в ротор закрытыми.

Если в процессе центрифугирования пробирки с биоматериалом разбились, следует тщательно вычистить ротор и камеру центрифуги во избежание инфицирования рабочей среды и загрязнения последующих партий биоматериала.

При работе с термолабильными веществами может потребоваться осуществлять центрифугирование при низкой температуре. Для этого применяются центрифуги с охлаждением. На рис.6 представлена настольная центрифуга с охлаждением 5417R фирмы Eppendorf- Netheler-Hinz (Германия), быстро развивающая максимальную rcf до 25000 x g и быстро охлаждающая содержимое пробирок. Такой температурный режим требуют и ультрацентрифуги, т. е. устройства, развивающие особенно высокую скорость вращения ротора и относительную силу центрифугирования - до 165000 x g.

Рис. 6. Центрифуга с охлаждением 5417 R (Eppendorf - Netheler-Hinz,Германия) для центрифугирования микролитровых объемов и 8-позиционных стрипов.

Центрифугирование в градиенте плотности - метод разделения смеси веществ с помощью центрифугирования, основанный на разном поведении частиц в центробежном поле. Частицы, имеющие разную плотность, размеры и форму, осаждаются с разной скоростью. При наслаивании исследуемого образца на поверхность раствора с непрерывным градиентом плотности частицы при центрифугировании распределяются вдоль градиента в виде дискретных зон или полос. Для создания градиента плотности используют растворы солей тяжелых металлов, сахарозы. Благодаря градиенту плотности смешивания зон не происходит. Этот способ разделения может быть использован как для препаративных, так и аналитических целей. В первом случае выделяется биоматериал для последующих биохимических исследований, во втором - изучаются чистые или практически чистые препараты макромолекул или частиц.

Электрофорез - метод разделения заряженных частиц при движении их в растворе под действием внешнего электрического поля. Метод основан на свойстве ионизированных, т. е. несуших заряд, молекул двигаться к электродам. В растворе более кислом, чем изоэлектрическая точка растворенного вещества, амфолит способен приобретать положительный или отрицательный заряд. Связывая протоны, вещество становится заряженным положительно и двигается к отрицательно заряженному катоду; при потере протонов, приобретая отрицательный заряд, молекула движется к положительно заряженному аноду.

Предложенный Тизелиусом в 1937 году свободный электрофорез в клинических лабораториях не применяется. Широкое практическое применение приобрел *зональный электрофорез*, представляющий собой миграцию в пористой поддерживающей среде заряженных молекул, образующих зоны, которые затем могут выявляться окрашиванием тем или иным специфическим красителем с последующей элюцией и фотометрией или прямой денситометрией.

Процедура электрофореза состоит в том, что гидратированный поддерживающий материал помещается в электрофоретическую камеру, содержащую буферный раствор (рис. 7). Избыток буферного раствора должен быть удален. Проба наносится на поддерживающий материал. Устанавливается требуемая постоянная сила тока или напряжение. Процесс разделения протекает необходимый промежуток времени. Поддерживающий материал вынимают из камеры и быстро высушивают или помещают в закрепитель для предупреждения диффузии компонентов пробы. Зафиксированный поддерживающий материал окрашивают, чтобы выявить зоны от-

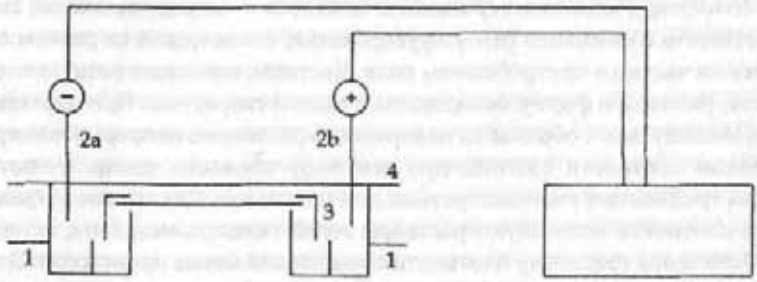


Рис. 7. Схема устройства аппарата для электрофореза.
1. Камеры с буферным раствором. **2.** Электроды: **2а** - анод, **2б** - катод. **3.** Твердый носитель для разделения фракций. **4.** Крышка. **5.** Источник постоянного тока.

дельных белков. После удаления из белка красителя поддерживающий материал высушивают или обрабатывают просветляющим реагентом.

Скорость миграции молекул зависит от электрического заряда молекулы, ее размера, силы электрического поля, свойств поддерживающей среды, температуры.

$$m = \frac{Q}{Krh}$$

где: m - электрофоретическая подвижность в см,
Q - заряд молекулы,
K - константа,
r - ионный радиус мигрирующей частицы,
h - вязкость раствора, в котором перемещается частица.

Таким образом, электрофоретическая подвижность частицы, молекулы прямо пропорциональна ее заряду и обратно пропорциональна размеру частицы и вязкости раствора (электрофоретического буфера).

На поверхности материала носителя фиксируются отрицательные заряды (в определенных условиях - положительные). Вокруг носителя концентрируются неподвижные положительные заряды, слой которых вместе с зарядом поверхности носителя формируют потенциал Штерна. Следующий слой подвижных, преимущественно положительных ионов образует электрокинетический (или Zeta) потенциал. Сумма потенциала Штерна и Zeta-потенциала составляет электрохимический (эпсилон) потенциал. Остальная жидкость представлена гомогенным раствором, в котором в равной пропорции содержатся оба вида ионов. (рис. 8)

Буферный раствор выполняет двойную роль: он проводит электрический ток и благодаря своей pH определяет электрический заряд растворенного вещества. Ионная сила буфера определяет толщину ионного облака, окружающего заряженную молекулу, скорость миграции и ширину зон. Повышение ионной силы за счет увеличения концентрации ионов буфера расширяет ионное облако вокруг заряженной молекулы, зоны становятся четче, но эти преимущества снижаются из-за теплового эффекта и денатурации теплолабильных белков.

Наиболее часто применяется барбиталовый буфер (ионная сила 0,025-0,075) и трис-буфер (ионная сила 0,03-0,12). Ассоциация с белком оснований в этих буферных растворах минимальна.

Происходящие при проведении электрофореза активные физико-химические процессы следует иметь в виду и принимать меры для предотвращения их нежелательного дестабилизирующего влияния на условия разделения аналитов. Движение буферного раствора из камер в поддерживающий материал может помешать перемещению белков и исказить результаты. Поэтому электрофорез целесообразно проводить в закрытой и охлаждаемой камере, чтобы не происходило интенсивного испарения буферного раствора с поверхности носителя.

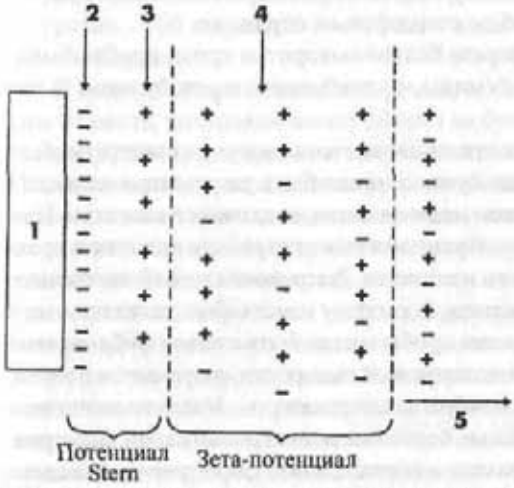


Рис. 8. Схема распределения электрических потенциалов при электрофорезе (По Epstein, 1987). **1.** Плотная подложка. **2.** Фиксированный заряд поверхности подложки (отрицательные ионы). **3.** Слой немобильных ионов (положительные ионы). [Фиксированный заряд и немобильные ионы составляют вместе потенциал Stern]. **4.** Подвижные ионы (преимущественно положительно заряженные) составляют электрокинетический или зета - потенциал. [Потенциал Stern и зета - потенциал вместе составляют электрохимический потенциал]. **5.** Гомогенный раствор.

Процесс электрофореза меняет состав буфера. При малом объеме камер происходит электролиз воды, pH меняется и буфер необходимо менять после каждого прогона электрофореграммы. Камеры большого объема достаточно менять местами (т. е. менять полярность) после каждого прогона, что позволяет использовать буфер для 3-4 процедур. Можно также сливать буфер из обеих камер вместе, давать отстаиваться при 4°С, что также позволяет использовать его четырежды.

Для визуализации зон на электрофореграмме применяются различные красители. Для окрашивания электрофореграмм белков крови используют амидочерный, бромфенол голубой, кумасси бриллиантовый-голубой, Понсе S. Раствор красителя может использоваться несколько раз. Принято считать, что 100 мл раствора красителя могут эффективно окрасить до 387 см² пленки из ацетатной целлюлозы или агарозы. Подозрение о негодности раствора красителя возникает, если происходит выщелачивание окрашенной зоны при промывании фореграмм 5% уксусной кислотой или на этапе просветления (в отношении ацетатной целлюлозы).

За разделением фракций белков должна следовать их идентификация и количественная оценка. Идентификация осуществляется по положению зон по отношению к месту старта или по сопоставлению с параллельно разгоняемой пробой со стандартным образцом.

При обычном электрофорезе белков сыворотки крови проба обычно делится на 5 фракций: альбумины, α_1-глобулины, α_2-глобулины, β-глобулины, γ-глобулины.

При некоторых условиях эти типичные зоны могут выглядеть необычно. Так, расширение зоны альбумина может быть результатом наличия в крови связанных с альбумином медикаментов, вводимых пациентам. Необычная зона между α_1- и β-глобулинами может отражать наличие в крови гемоглобин-гаптоглобинового комплекса. Расширение зоны β-глобулинов может быть следствием гемолиза, поскольку гемоглобин движется в этой зоне. Полоса в месте нанесения пробы может быть следом фибриногена, денатурированного белка из испорченной сыворотки, результатом повреждения ацетат-целлюлозной мембраны аппликатором. Наличие значительного числа зон индивидуальных белков на полиакриламидной фореграмме требует для их идентификации параллельной фореграммы, заведомо содержащей известный белок, который хотят отыскать в изучаемой пробе. Иногда искомый белок приходится идентифицировать иммунологическим методом с помощью соответствующего ему антитела.

Количественная оценка соотношений фракций белков осуществляется с помощью прямой денситометрии (в последнее время - преимущественно таким образом) либо путем фотометрии элюатов отдельных полос электрофореграммы.

Отдельные окрашенные полосы носителя вырезаются, помещаются в определенный объем растворителя (основного буфера, спиртового раствора), элюаты фотометрируют. Результаты выражают либо в процентах по отношению к сумме всех отсчетов, принятой за 100, либо соотносят с содержанием общего белка и выражают в единицах массовой концентрации.

Денситометрия состоит в сканировании просветленных, окрашенных и зафиксированных полос носителя. Результаты выражаются в графической форме череды пиков и в цифровой форме процентных соотношений. Различные красители требуют различных длин волн при денситометрии: амидочерный - 640 нм; бромфенол синий - 600 нм; кумасси бриллиант синий G-250 - 595 нм; кумасси бриллиант голубой R-250 - 560 нм; нигрозин - 540 нм; понсо S - 520 нм; нитротетразолий голубой - 570 нм; судан красный 7B - 540 нм; масляный красный O - 520 нм; судан черный B - 600 нм.

При спектрофотометрии элюата длины волн несколько отличаются:

амидочерный - 600 нм; бромфенол синий - 595 нм; кумасси бриллиант голубой G-250 - 610 нм; кумасси бриллиант голубой R-250 - 580 нм; нигрозин - 560 нм; понсо S - 565 нм в щелочной среде и 520 нм в нейтральной среде.

В зависимости от типов носителей, в которых происходит разделение веществ, различают электрофорез на бумаге, на ацетате целлюлозы, в геле (крахмала, агарозы, агара, полиакриламида), в тонком слое сорбента (окиси кремния, кизельгура, окиси алюминия, целлюлозы). Способность некоторых носителей при соприкосновении с водой приобретать отрицательный заряд за счет адсорбции гидроксильных ионов лежит в основе эндоосмоса, т. е. движения ионов сольвента, в том числе и компонентов сыворотки, в сторону, противоположную ожидаемой. При малом заряде молекул разделяемой смеси и сильном заряде носителя молекулы могут просто оставаться на месте нанесения пробы. Сильным эндоосмосом обладает целлюлозная бумага, ацетат целлюлозы, обычный агарозный гель, наименее велик эндоосмос в крахмальном и полиакриламидном геле, в очищенной агарозе.

Электрофорез на бумаге применялся для разделения сывороточных белков. Его преимуществом является легкость проведения, низкая стоимость, однако разделение требует длительного времени - до 14-16 ч.

Электрофорез на геле агарозы (0,5-1,0 г агарозы на 100 мл) используется для разделения белков сыворотки крови, вариантов гемоглобина, изоферментов лактатдегидрогеназы, фракций липопротеинов и т. п. Для разделения требуется 0,6-3,0 мкл крови. Время разделения – 30-90 мин. Агароза представляет собой одну из фракций агара, практически не содержащую ионизируемых групп, не проявляет эндоосмоса, не обладает сродством с белками и, таким образом, не влияет на скорость их миграции. Поскольку сохраняет прозрачность после высушивания, удобна для прямой денситометрии. (Рис.9)

Электрофорез на ацетате целлюлозы - для разделения требуется 0,3-2,0 мкл крови; время разделения - 20-60 мин. Мембраны ацетилированной целлюлозы представляют собой переплетение волокон, между которыми располагаются заполненные воздухом полости. При погружении мембраны в буфер полости заполняются жидкостью. Свойства мембран зависят от технологии ацетилирования, величины пор и толщины мембраны.

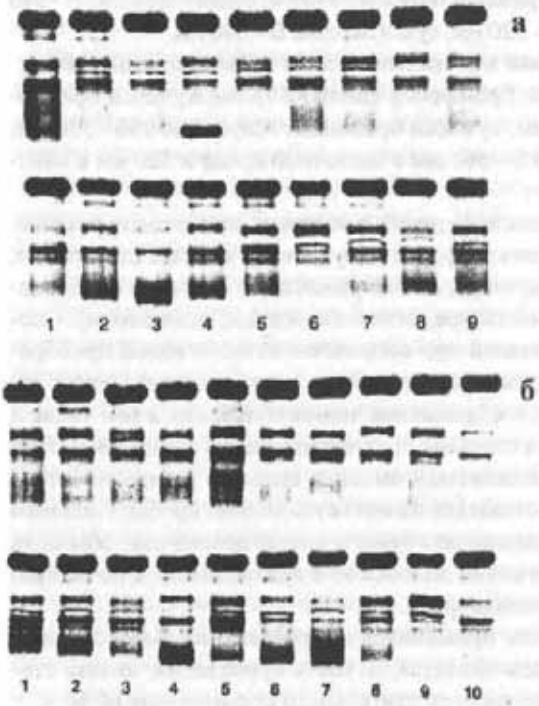


Рис. 9. Разделение фракций белков сыворотки крови на геле агарозы (Биохимическая лаборатория ЦКДЛ Клинического центра ММА им. И.М.Сеченова; аппарат для электрофореза Paragon фирмы Beckman, США)

а. Выявление М-градиента γ-глобулинов при миеломе: полоска 4 в верхнем ряду.

б. Повышение фракции α_2 - глобулина и снижение γ-глобулинов при нефротическом синдроме : полоска 9 в нижнем ряду.

Для проведения денситометрии необходима обработка мембран просветляющими реагентами, чаще всего это смесь 95 частей метанола и 5 частей ледяной уксусной кислоты. Преимуществом является стабильность просветленной полоски.

Электрофорез на полиакриламидном геле - позволяет выделить 20 и более фракций белков, включая изоферменты и генетические варианты.

В этом варианте электрофоретического разделения используется несколько слоев геля, отличающихся составом и величиной пор. В связи с неоднородностью поддерживающего материала и дискоидной формой зон белков этот вариант иногда называют диск-электрофорезом.

Первоначально технология приготовления многослойного геля состояла в полимеризации мономерного геля и реагента, образующего перекрестные связи, под действием катализатора. Этот разделительный слой имеет мелкие поры, размером около 5 нм. Поверх него образуется слой геля с широкими порами. Третий, верхний слой образован гелем с широкими порами, содержащим 3 мкл сыворотки.

При проведении электрофореза белковые ионы проходят через слой с широкими порами и задерживаются вдоль конца разделительного геля, образуя очень тонкие зоны, распределение которых зависит не только от заряда молекул, но и от их размера. Это обстоятельство и позволяет разделять многие варианты белков сыворотки. Современные варианты этой технологии упрощены за счет исключения образования двух последних слоев. Неразведенная сыворотка наносится прямо на верхнюю поверхность разделительного слоя. Полиакриламидный гель термостабилен, прозрачен, химически почти инертен, не обладает зарядом, что исключает электроэндоосмос.

Электрофорез на крахмальном геле также позволяет распределять ионизированные макромолекулы на основе величины заряда и размера молекул. Гель частично гидролизованного крахмала в концентрации 10-16 г/100 мл может быть использован для проведения электрофореза как в горизонтальном, так и в вертикальном направлении. Самостоятельное приготовление этого геля относительно сложно и требует определенного навыка.

Высоковольтный электрофорез - благодаря применению более высокого, чем обычно, напряжения электрического тока достигается разделение относительно слабо заряженных веществ (например, метаболиты катехоламинов). Ввиду высокой теплопродукции во избежание пересыхания носителя требуется постоянное охлаждение камеры, где осуществляется электрофорез.

Изоэлектрическое фокусирование - метод фронтального электрофореза в градиенте pH. Разделение амфотерных веществ (аминокислот, пептидов) осуществляется на вертикальной колонке из амфолитов. Каждое вещество движется в электрическом поле к той части колонки, где значение pH соответствует его изоэлектрической точке и там останавливается (фокусируется) (рис.10). Метод позволяет разделять белки, чья pI различается более чем на 0,02 единицы pH.

Градиент pH создается за счет использования амфотерных полиаминокарбоксильных кислот с молекулярной массой от 300 до 1000. Анод окружен раствором с кислой реакцией, катод - с щелочной. При проведении электрофореза смесь амфолитов, состоящая из 50-100 различных соединений, создает градиент pH, когда каждый из компонентов достигает своей изоэлектрической точки. Для распределения амфолитов, используемых в высокой концентрации, приходится применять высокое напряжение (до 2000 V), что вынуждает охлаждать систему. Необходимо обеспечить соблюдение постоянства условий электрофореза, исключить падение тока, вызванное низкой проводимостью амфолитов в их изоэлектрических точках и образованием зон чистой воды в системе.

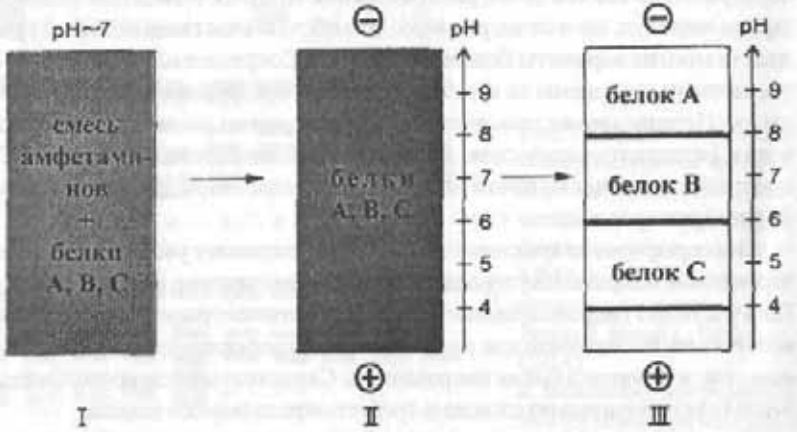


Рис. 10 - Схема изоэлектрического фокусирования (По Epstein, 1987)
1. Гомогенная смесь носителей амфолитов с pH от 3 до 10; белки: A (pH 8), B (pH 6), C (pH 4). 2. Подача напряжения побуждает амфолиты быстро занять зоны pH, где их заряд равен нулю. 3. Белки A, B, и C соответственно своей молекулярной массе мигрируют к соответствующим их pH зонам, стабильность которых создается благодаря высокой буферной способности носителей амфолитов.

При выборе поддерживающей среды важно исключить влияние размера молекул белков на их продвижение в электрофоретической системе, т. е. *поддерживающий материал должен иметь достаточно большой размер пор.* В связи с этим обстоятельством, наряду с полиакриламидным гелем с широкими порами, применяется также агароза и ацетатная целлюлоза.

Современные технические средства позволяют автоматизировать процедуру электрофореза, начиная от нанесения пробы на носитель и заканчивая выдачей результатов в графической и цифровой формах.

Капиллярный электрофорез - осуществляется в капиллярных трубках (рис. 11), что позволяет уменьшить объем исследуемого образца до нескольких нанолитров, значительно сократить время разделения (до нескольких минут), повысить точность определения, автоматизировать процедуру разделения веществ. Так, в аппарате для капиллярного электрофореза Paragon CZE 2000 фирмы Beckman (США) разделение белков происходит в силиконовых трубках в щелочном (pH 10) боратном буфере, что обусловливает отрицательный заряд белковых молекул. При подаче напряжения (9000 вольт) возникающий сильный электроосмотический поток превышает электрофоретическую подвижность белков и увлекает их к катоду. Светопоглощение белковых молекул при 214 нм отслеживается ультрафиолетовым детектором, который размещен у катода и в створе оптического окна капилляра. След абсорбции каждой белковой фракции сопоставляется с временем ее миграции, что позволяет за-

Рис. 11. Схема аппарата для капиллярного электрофореза. **1, 2, 5.** Капиллярная трубка. **3.** Детектор. **4.** Измерительный прибор. **6, 7** Буферный раствор, исследуемая проба. **8, 9.**Емкость для буферного раствора и пробы. **10.** Источник тока.

писать электрофореграмму (*рис.12*). Различные варианты метода используются для разделения белков, углеводов, ДНК, лекарств, метаболитов. Мультикапиллярные устройства позволяют осуществлять *параллельное разделение нескольких видов аналитов*, например, сывороточных белков, иммуноглобулинов, гемоглобинов и т. п. Капиллярный электрофорез применим и в микроустройствах *для разделения* различных аналитов, так называемых микрочипах, где время разделения компонентов пробы может быть менее 100 с.

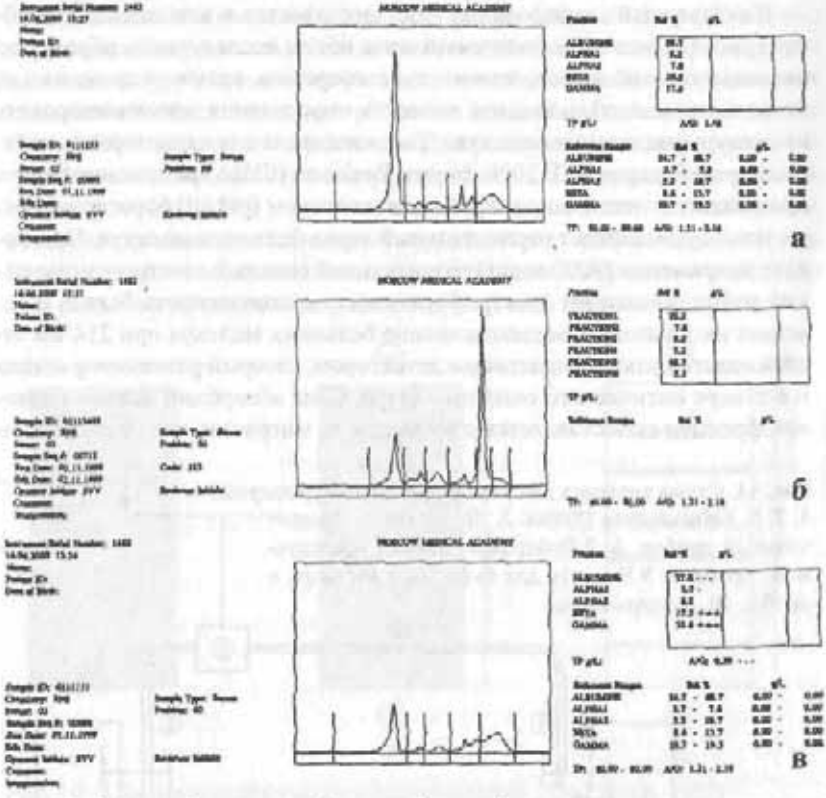


***Рис. 12** - Электрофореграммы белковых фракций сыворотки крови, полученные на аппарате для капиллярного электрофореза* Paragon CZE 2000 *фирмы* Beckman (США): **а** Нормальное соотношение фракций белков; **б** Повышение фракций β- и γ– глобулинов; **в** *М-градиент γ– глобулинов* (Биохимическая лаборатория ЦКДЛ Клинического центра ММА им. И.М. Сеченова).

Комбинация электрофореза с иммунофиксацией и субтракцией позволяет точно определять специфичность белкового расстройства. Иммунофиксация состоит в связывании фракций белков сыворотки со специфическими антителами, закрепленными в лунках сефарозы. Связавшаяся с антителом фракция белка не выявляется при последующем электрофорезе сыворотки. В данном варианте метода проба разведенной сыворотки наносится на 5 различных подложек, каждая из которых содержит специфическое антитело - три из них специфичны для тяжелых цепей иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM), а два - по одной - для легких цепей - каппа и лямбда. После контакта с твердой подложкой проба подвергается электрофорезу параллельно с необработанной пробой сыворотки. Специфический иммуноглобулин идентифицируется отсутствием соответствующего пика при сравнении с референтной электрофореграммой (рис.13).

Хроматография - это совокупность методов разделения и анализа смесей веществ, основанных на различном распределении компонентов между подвижной (газ или жидкость) и неподвижной (жидкость, твердый сорбент или их смесь) фазами хроматографической системы.

Хроматографическое разделение смеси аналитов основано на разнице скоростей перемещения масс различных веществ, растворенных в подвижной фазе и протекающих сквозь стационарную фазу. Компоненты образца биоматериала движутся через хроматографическую систему только тогда, когда они находятся в подвижной фазе.

Разделение зависит от разной степени физического взаимодействия веществ со стационарной фазой. Вещество, более сродственное со стационарной фазой, продвигается более медленно через систему, чем вещество, более сродственное с подвижной фазой. Характеристики подвижной и стационарной фаз, характеристики аналитов в подвижной фазе, характеристики пористой среды, динамика потока - определяют скорости прохождения отдельных веществ через хроматографическую систему и разделение их. Взаимодействие растворенных веществ с подвижной и стационарной фазой регулируется физико-химическими процессами: поверхностной адсорбцией, разделением жидкостей, ионным обменом, стерической эксклюзией, молекулярным сродством.

Старейшей формой хроматографии была поверхностно-адсорбционная - жидкостно-твердофазная. Русский ученый Цвет в 1906 г. использовал колонку карбоната кальция для разделения растительных пигментов на ряд окрашенных полос (отсюда и возникло название метода).

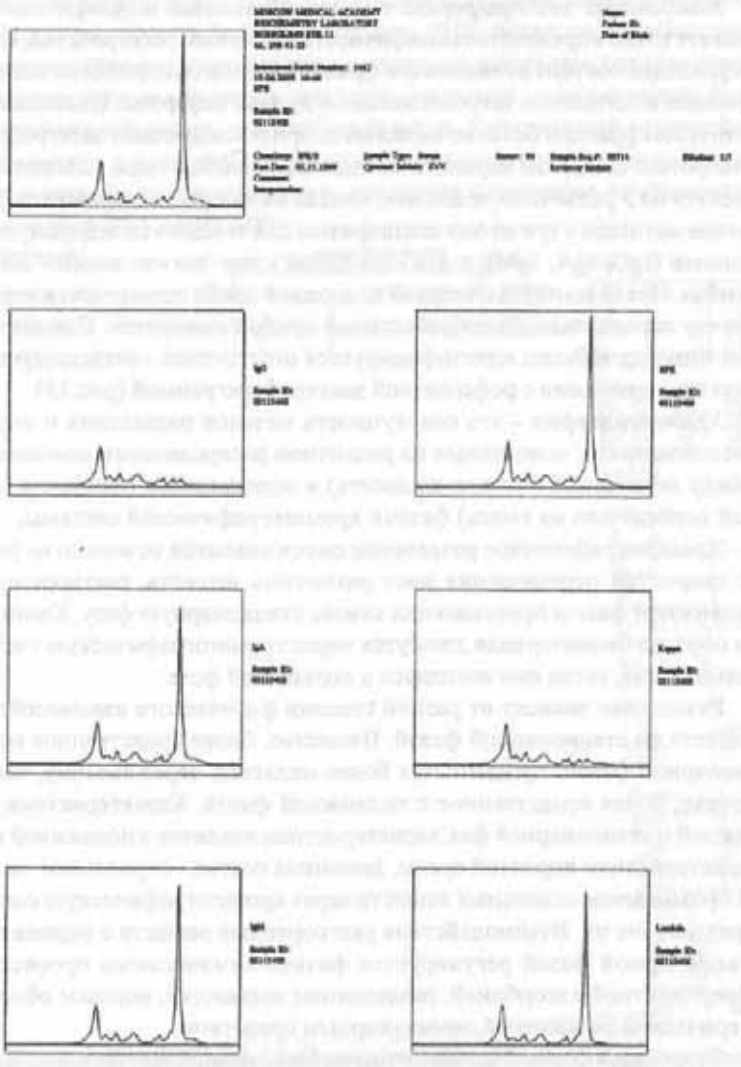


Рис. 13. Иммуносубтракция с последующим капиллярным электрофорезом: слева вверху - электрофореграмма без иммуносубтракции; ниже - электрофореграммы после субтракции, отсутствие пиков фракций IgG и легких каппа-цепей. (Биохимическая лаборатория ЦКДЛ Клинического центра ММА им. И.М. Сеченова).

За более чем 90-летний период со времени первых работ с использованием этого принципа разделения веществ было предложено, изучено, теоретически обосновано и практически опробовано значительное число вариантов методов хроматографии. Классифицировать их можно по: а) механизму разделения; б) физическому состоянию стационарной и подвижной фаз.

В основе механизма поверхностно-адсорбционной хроматографии лежат электростатические, водородные, дисперсионные взаимодействия. В газовой хроматографии осуществляется анализ низкомолекулярных веществ (метилового, этилового и изопропилового спиртов, а также таких газов, как кислород, азот, углекислый газ) с помощью так называемых «молекулярных сит», алюминия.

В жидкостном варианте хроматографии используются три типа адсорбентов. К неполярной группе относятся древесный уголь и полистирен-дивинил бензен. Алюминий выступает в роли полярного адсорбента со свойствами основания. Подвижная фаза и растворенные вещества конкурируют за связывающие участки стационарной фазы в соответствии с собственной силой растворения и свойствами (основными, кислыми, нейтральными) стационарной фазы.

Точно так же следует подбирать сольвенты для элюирования адсорбированного на стационарной фазе аналита. Слабым местом этого механизма разделения является трудность обеспечения гомогенного распределения связывающих участков. Поэтому поверхностно-адсорбционный принцип хроматографии относительно редко применяется в клинической аналитике.

Принцип распределительного варианта хроматографии основан на различиях растворимости молекул растворяемого вещества в двух несмешивающихся жидкостях, которые соприкасаются друг с другом (жидкостно-жидкостная хроматография). Распределение веществ между жидкостями выражается коэффициентом распределения (Kd), т. е. отношением растворимости вещества в экстрагирующей жидкости (стационарная фаза) к его растворимости в исходном растворе (мобильная фаза). Полярные вещества лучше растворимы в полярных сольвентах, и наоборот.

В нормально-фазной распределительной хроматографии полярный сольвент используется в качестве стационарной фазы, а неполярная смесь служит мобильной фазой. В обратно-фазной хроматографической системе стационарная фаза менее полярна, чем мобильная. Популярность этого варианта резко возросла с использованием неполярной стационарной фазы, химически связанной с инертным носителем.

В ионообменной хроматографии отделение искомого вещества из исследуемой пробы, содержащей смесь, происходит на основе различий знака и величины ионного заряда неорганических ионов, аминокислот, белков, нуклеотидов.

Катионобменная смола имеет много отрицательно заряженных ковалентно связанных функциональных групп. Эти группы окружены катионами (например, Na+), которые способны обмениваться с катионами растворенного вещества.

Анионобменная смола обладает сильноосновными четвертичными аминами (триэтиламиноэтиловые группы) или слабоосновными группами (аминоэтил, диэтиламиноэтил и др.), которые могут создавать положительный заряд. Окружающие их анионы (например, OH^-) легко обмениваются с анионами исследуемого раствора. Адсорбированные на смоле ионы элюируются путем изменения pH и ионной силы мобильной фазы. Имеет также значение ионобменная селективность.

Для моновалентных катионов эта зависимость выглядит следующим образом:

$Li^+ < H^+ < Na^+ < NH4^+ < K^+ < Rb^+ < Cs^+ < Ag^+$

Ряд анионов выглядит так:

$F^- < OH^- < CH_3COO^- < HCOO^- < H_2PO_4^- < HCO_3^- < Cl^- < NO_3^- < HSO_4^- < I^-$

Селективность в этом ряде обусловлена размером иона и его способностью проникнуть в смолу.

Отмеченные свойства метода позволяют гибко использовать его разновидности для решения широкого круга аналитических задач: выделения искомых аналитов, удаления интерферентов, деионизация воды и т. д. На рис. 14 приведен пример использования ион-обменной хроматографической колонки в применяемом при скрининге свинцовой интоксикации *ручном методе определения 5 - аминолевулиновой кислоты и порфобилиногена* в моче с последующим прибавлением реактива Эрлиха и спектрофотометрическим измерением (BIO-RAD Laboratories, США). Ионо-обменная хроматография используется и в технологически более сложных аналитических системах. На рис. 15 изображен анализатор ами*нокислот Biochrom 20 Plus (Biochrom Ltd, Англия), представляющий* собой управляемую компьютером жидкостную ионо-обменную хроматографическую систему, в которой используется контролируемый электроникой насос, автосемплер на 84 позиции с дозатором проб объемом от 1 до 5000 мкл, колонкой, снаряженной катион-обменной смолой с размером *частиц 3 мкм.*

Механизмы стерической эксклюзивной хроматографии (гельфильтрации, хроматографии на «молекулярном сите») основаны на различиях размеров молекул, а также их формы и степени гидратации. Стационарной фазой служат образующие гель гидрофильные материалы в форме мелких шариков, в том числе перекрестно-связанный декстран (Сефадекс), полиакриламид, агароза (Сефароза). Микрошарики имеют пористую структуру, содержат микроканалы и отверстия.

Задавая в процессе производства этих материалов определенный размер каналов и пор, можно сформировать стационарную фазу, избирательную для молекул соответствующего размера, которые способны задержаться в этих порах. Более крупные молекулы проходят вдоль колонки, *и, не будучи способными задерживаться, первыми попадают в элюат.* (рис.16) Возможность использования в качестве стационарной фазы гидрофобных материалов (полистиреновые шарики метилированного сефадекса, перекрестно-связанный полиметилакрилат) позволяет применять этот вид хроматографии для разделения веществ, растворимых только в органических растворителях (триглицериды, жирные кислоты).

Гельфильтрация может быть заменой диализа при освобождении растворов, содержащих белок, от солей.

Понятие «аффинная хроматография» охватывает множество механизмов разделения веществ, основанных на специфических взаимодействи-

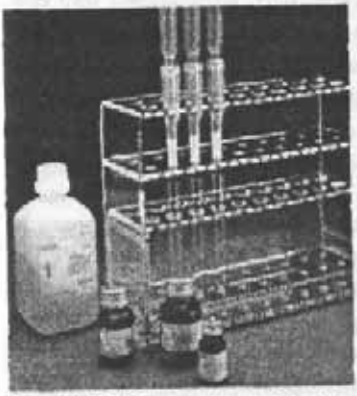


Рис. 14. Набор для ионо-обменного хроматографического определения 5- аминолевулиновой кислоты и порфобилиногена («BioRad *Laboratories*»).

Рис. 15. Ионо-обменный хроматографический анализатор аминокислот Biochrom 20 Plus («Biochrom Ltd», Англия).

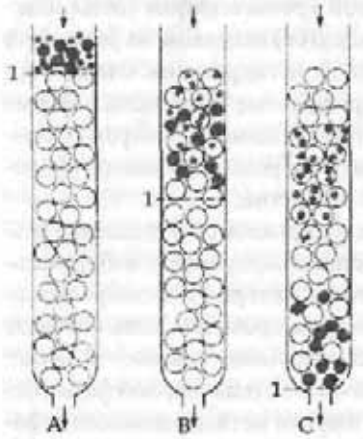


Рис. 16 . Устройство и механизм гель-фильтрации на колонке: 1 - Фронт сольвента; светлые кружки - частицы геля; крупные темные кружки - большие молекулы; мелкие темные кружки - малые молекулы.
А. Начало процесса гель-фильтрации: смесь молекул в верхней части колонки.
В. Продвижение смеси молекул между частицами геля.
С. Задержка малых молекул в верхней и средней частях колонки, большие молекулы элюируются с колонки.

ях между соединениями (фермент-субстрат; гормон-рецептор; антиген-антитело и др.).

В качестве стационарной фазы используется молекула, связанная с инертным носителем, т. е. лиганд. При строго определенных условиях (величина pH, ионная сила) обеспечивается связывание аналита с лигандом. Высвобождение аналита, т. е. его элюирование, достигается либо добавлением специфического агента (например, ингибитора или субстрата фермента), либо изменением pH или ионной силы, либо воздействием так называемого хаотропного реагента, т. е. способного разрывать водородные связи (мочевина, сульфат, гуанин гидрохлорид). Этот вариант хроматографии может использоваться как для подготовительной стадии анализа, так и при выделении изучаемого аналита (например, гликированного гемоглобина) от других его форм.

Классификация методов хроматографии по физическому состоянию стационарной и подвижной фаз практически связана с подбором соответствующих материалов для фаз и конструкцией хроматографических устройств.

Бумажная хроматография основана на использовании в качестве стационарной фазы различных сортов фильтровальной бумаги, подбираемых по степени гомогенности, толщине, доле примесей, скорости движения подвижной фазы. Этот относительно дешевый и быстрый способ разделения, однако, используется в клинико-лабораторной практике довольно редко.

Технологически близкой к бумажной хроматографии является *тонкослойная хроматография*, где носителем является тонкий (0,2 мм толщины) слой сорбента (силикагель, микроцеллюлоза, алюминий, сефадекс и др.), нанесенный на стеклянную или пластиковую пластинку. Проба наносится на этот слой в виде пятна поблизости от одного из краев пластинки. Этим краем пластинка в наклонном положении помещается в сольвент, подобранный в качестве мобильной фазы. В закрытом контейнере сольвент, благодаря капиллярному действию, движется вверх по слою сорбента, увлекая из пятна пробы разделяемые вещества. При достижении фронтом сольвента определенной высоты пластинка извлекается из контейнера, высушивается (рис.17). Высушенная пластина может быть подвергнута хроматографической процедуре повторно путем помещения в другой сольвент под углом 90°. При этом пятна смесей веществ, не разделенных при разгонке в одном направлении, могут быть разделены. Детекция пятен искомых веществ осуществляется путем ультрафиолетового облучения, опрыскивания пластинки специфическим окрашивающим раствором, с помощью ауторадиографии. Для количественного определения пятно изучаемого вещества может быть снято и экстрагировано.

Наряду со сравнением положения пятна изучаемого вещества с положением пятна стандартного образца, вещества на хроматограмме могут быть идентифицированы по величине Rf

$$Rf = \frac{\text{расстояние продвижения пятна вещества}}{\text{расстояние продвижения подвижной фазы}}$$

Следует учитывать, что некоторые вещества имеют одинаковые величины Rf.

Точная количественная оценка содержания вещества на тонкослойной хроматограмме затруднена из-за возможных технологических влияний на размеры и интенсивность пятна. Тем не менее для определения ряда лекарств, липидов и некоторых других веществ денситометрия хроматограмм оказалась применимой.

На мировом рынке представлены гель-трансиллюминаторы - устройства для автоматизированного просмотра пластин геля (например, агарозы) после проведенного электрофореза или тонкослойной хроматографии, регистрации результатов в графической и цифровой формах. В программе компьютера заложены возможности юстировки прибора с учетом различных красителей. Полученные изображения полос разде-

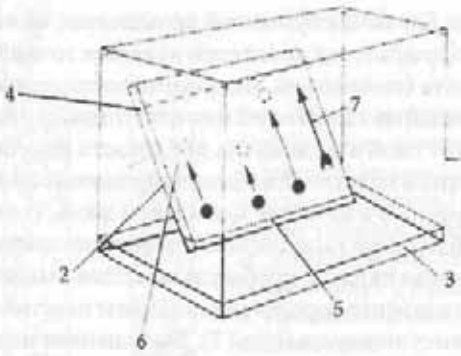


Рис. 17. Схема проведения восходящей тонкослойной хроматографии: **1.** Камера для хроматографии. **2.** Стеклянная пластинка, покрытая тонким слоем силикагеля. **3.** Сольвент. **4.** Фронт сольвента. **5.** Место нанесения пробы. **6.** Место, до которого мигрировали пробы. **7.** Направление движения сольвента.

ленных веществ могут быть сохранены на дискете для архива данных.

С помощью *газовой хроматографии* происходит разделение веществ, находящихся в газообразной форме, при движении подвижной фазы над стационарной фазой. Давление парообразной формы вещества определяет степень его распределения между подвижной и стационарной фазами и быстроту его элюции из хроматографической системы. При наличии у одного из веществ, находящихся в смеси, избирательного взаимодействия со стационарной фазой эффективность разделения возрастает.

Стационарная фаза может быть представлена твердым веществом с большой поверхностной зоной или нелетучей жидкостью, покрывающей твердый носитель. Этот последний, газо-жидкостный вариант, используется в клинической аналитике.

Подвижную фазу образует инертный газ (азот, гелий, аргон), который переносит исследуемую пробу сквозь колонку. На выходе из колонки устанавливается детектор, который улавливает элюируемые с колонки компоненты и регистрирует их в виде пиков на результирующем графике (рис. 18). Положение максимума пика используется для идентификации вещества, его расстояние от исходной точки характеризует **время задержки** как специфическое свойство исследуемого соединения. Высота пика или площадь под его контуром служит для количественной оценки компонента.

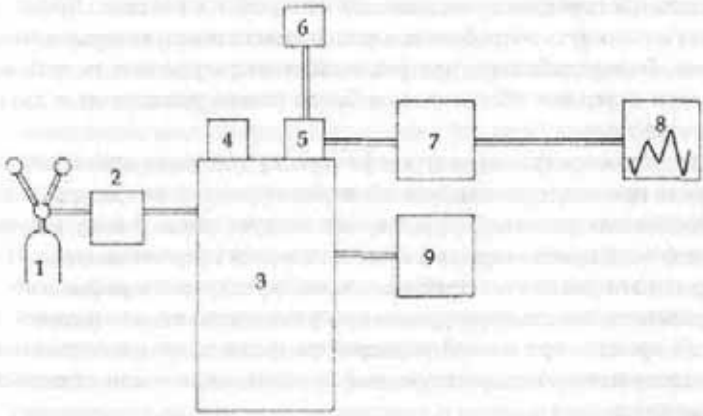


Рис. 18. Схема устройства газового хроматографа: **1.** Газовый баллон с регулятором давления. **2.** Регулятор газа. **3.** Колонка. **4.** Инжектор **5.** Детектор. **6.** Устройство для сбора элюата и приборы для идентификации элюированных компонентов (масс-спектрометр, спектрофотометр). **7.** Электрометр (усилитель электрического сигнала). **8.** Самописец. **9.** Контроль температуры.

Процесс газовой хроматографии осуществляется в специальных приборах - газовых хроматографах, представляющих систему из нескольких модулей.

Устройство для подачи газа-переносчика должно обязательно быть снабжено приспособлением для контроля за скоростью потока газа, поскольку от этой скорости в определенной мере зависит величина времени задержки разделяемых компонентов.

Тип **инжектора** пробы связан с характером ее материала. Газ вводится в прибор с помощью газового шприца и дозирующего газ клапана, жидкость вводится в поток газа микролитровым шприцем через самозатягивающуюся перепонку прибора. Твердый материал предварительно растворяется и вводится в жидкой форме. Инжектор должен быть достаточно разогрет, чтобы обеспечить быстрое испарение компонентов пробы, не иметь избыточного мертвого пространства (для избежания диффузии пробы и нежелательного «распластывания» пиков компонентов), дозировать достаточно малые объемы (2-10 мкл). Поскольку многие исследуемые вещества имеют высокую температуру кипения, возникает необходимость введения их в форме летучих производ-

ных для обеспечения немедленного испарения в колонке. Кроме того, может возникнуть потребность в таких производных, которые менее полярны, более стабильны при высокой температуре или за счет иного времени задержки обеспечивают более четкое разделение с другими компонентами.

Полноценное газо-хроматографическое разделение веществ возможно лишь при поддержании по всей длине колонки температуры в строго определенных рамках. В то же время следует иметь в виду наличие в исследуемой пробе веществ с отличающимися точками кипения. Чтобы сочетать эти различные требования, газовые хроматографы снабжают устройством для температурного программирования, что позволяет начинать процесс при низкой температуре (разделение низкотемпературных компонентов) с последующим ее постепенным или ступенчатым повышением.

Колонки для газовой хроматографии изготавливают из стекла или из нержавеющей стали. Каждый из этих материалов имеет свои достоинства и недостатки: стальные дешевы и прочны, их поверхность не обладает адсорбционными свойствами, они имеют высокую теплопроводность. Однако некоторые вещества могут вступать в реакцию с металлом (холестерин, галогены). Стеклянные колонки позволяют визуально контролировать полноценность загрузки колонки и наличие нелетучих остатков. Однако эти колонки хрупки, требуют дезактивации активных участков внутри колонки. Внутренний диаметр колонок от 0,1 до 0,4 см. Его величина имеет значение для емкости по отношению к пробе, однако чрезмерное его увеличение понижает эффективность разделения компонентов. Длина колонок от 1 до 4 м. Более длинные колонки обеспечивают более четкое разделение, однако, чрезмерная длина колонки вызывает необходимость повышения объема газа-переносчика, приводит к трудностям при введении проб и к потерям газа.

Наименьший внутренний диаметр (0,02-0,05 см) и наибольшую длину (10-150 м) имеют капиллярные колонки. Они нужны для разделения очень близких изомеров (углеводородов, ароматических соединений). Колонки заполняют материалом инертного носителя, чаще всего кремния. Он должен обладать достаточно большой поверхностью и служит для удержания на ней тонкого слоя стационарной фазы. Размер частиц носителя указывают в мешах (mesh), которые соответствуют числу отверстий на квадратный дюйм в сите, через которое просеивают носитель. Обычно в лабораторной аналитике используют носитель с части-

цами 80-100 меш и 100-120 меш. Чем меньше размер частиц носителя, тем выше разделительная способность колонки.

Выбор жидкости для стационарной фазы должен определяться в зависимости от анализируемых веществ.

Соотношение жидкой фазы с носителем (по весу) может составлять от 1 до 50%. Вещества с малой летучестью (стероиды) лучше разделяются на колонках с малой загрузкой, тогда как высоколетучие легкие углеводороды лучше разделяются на высокозагруженных колонках (20-30%). Время задержки возрастает с увеличением содержания жидкой фазы.

В наибольшей степени требованиям, предъявляемым к стационарной фазе, соответствуют метил-силиконовые полимеры, замещенные силиконовые полимеры, силиконовые полиэфиры.

Неселективные стационарные фазы лучше разделяют соединения с различающимися молекулярными массами и точками кипения, неполярные вещества. Селективные фазы предпочтительны для разделения изомеров и веществ с различной полярностью.

Загрязнение жидкой фазы низкомолекулярными короткими полимерами удаляется нагреванием колонки на 30-40°С выше обычной рабочей температуры в течение 12-24 ч (при отключенной линии детекции, но при нормальном продуве газа-переносчика). После этой процедуры хроматограмма не должна содержать никаких пиков или зубцов.

Детекция компонентов на выходе с колонки осуществляется различными способами. Детектор теплопроводности регистрирует ее изменение, вызванное наличием в токе газа исследуемых компонентов. Детектор состоит из металлического блока с двумя изолированными каналами, содержащими разогретые вольфрамовые или вольфрам-рениевые волоски, соединенные своими концами с мостиком Уитстоуна. При прохождении струи газа-переносчика, содержащего исследуемые вещества, через одну из полостей детектора происходит изменение теплопроводности, температуры и электрического сопротивления по сравнению с контрольной полостью, где газ без аналитов не приводит к таким изменениям. Величина изменения сопротивления и, значит, напряжения в сети регистрирующего устройства, усиливается электрометром и записывается на графике хроматограммы в виде пика, величина которого пропорциональна количеству исследуемого вещества.

В процессе детекции проба не претерпевает разрушения и может использоваться в дальнейших исследованиях. Детектор позволяет исследовать газы воздуха и другие вещества, не определяемые ионизацион-

ным детектором. Однако способ относительно мало чувствителен, дает дрейф основной линии.

Большей чувствительностью и селективностью обладает детектор электронного захвата, определяющий лишь те соединения, которые способны захватывать электроны (например, галогенизированные соединения или галогенизированные производные веществ другого строения). При прохождении через детектор потока газа-переносчика с разделенными компонентами пробы происходит его ионизация под влиянием радиоактивного источника (^{3}H; ^{63}Ni), связанного с катодом детектора. Фиксированный потенциал электрода привлекает все содержащиеся в потоке ионы и электроны, что обеспечивает слабый постоянный ток в детекторе. В присутствии веществ, захватывающих электроны, сила тока падает, а происходящие изменения регистрируются на графике в форме положительного пика.(рис.19) Недостатком этого вида детекторов является их чрезмерная чувствительность по отношению к примесям, содержащимся в исследуемой пробе.

Наиболее широкое применение в клинической аналитике благодаря простоте конструкции и эксплуатации, надежности в работе и высокой чувствительности, а особенно их способности определять все органические соединения, получили пламенно-ионизационные детекторы. (Газы и неорганические соединения нельзя определять этим видом детекторов) Смесь газообразного водорода с эффлюэнтом, выходящим из колонки, при прохождении через сопло детектора возгорается, что вызывает ионизацию веществ, содержащихся в смеси. Высвобожденные электроны аккумулируются коллектором, охватывающим пламя. Разница потенциалов между служащими электродами соплом и коллектором (около 300V) создает постоянный ток, пропорциональный количеству сгоревшего в пламени вещества пробы. Изменения тока регистрируются на графике (рис.20).

Важным фактором для эффективности детекции служит отношение между скоростями потока водорода и газа-переносчика, от величины которого зависит температура пламени и степень ионизации изучаемых веществ. Вариант этого типа детекторов - азотнофосфорный детектор - снабжен колпачком из спрессованных щелочных солей (например, сульфата рубидия) возле сопла, где происходит сжигание пробы. Присутствие щелочных атомов в пламени повышает величину сигнала в детекторе в 15 раз в отношении азотосодержащих соединений и в 300 раз в отношении фосфоросодержащих соединений.

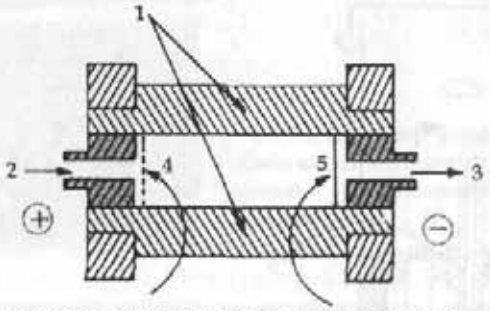


Рис. 19. Схема устройства детектора электронного захвата:
1. Стенки камеры. **2.** Приток эффлюента с колонки. 3. Диффузор газа. **4.** Радиоактивный источник.

Наиболее популярным вариантом жидкостной хроматографии в клинической аналитике является так называемая **высокопроизводительная жидкостная хроматография (ВПЖХ)**, выполняемая в соответствующих устройствах, обладающих многокомпонентной структурой, - жидкостных хроматографах (рис.21)

Подвижная фаза, содержащаяся в резервуаре из темного стекла, подается насосом через инжектор в колонку. Конструкция насоса должна обеспечивать минимальные колебания потока жидкости, подаваемой со скоростью от 1 до 10 мл в минуту (рис.22). Состав подвижной фазы может быть постоянным (изократический способ) или меняться, плавно или ступенеобразно (градиентный способ) с помощью соответствующих конструктивных приспособлений и программирования работы насоса (или нескольких насосов).

Через петельный инжектор порция пробы вводится в колонку, представляющую собой трубку из нержавеющей стали (внутренний диаметр 7-8 мм, длина 5-150 см), заполненную стационарной фазой - кремнием, алюминием, древесным углем, органическими полимерами.

Материал стационарной фазы может быть в форме пористых макрочастиц (диаметр больше 40 мкм), микрочастиц (диаметр 3-10 мкм) или стеклянных шариков диаметром 20-60 мкм, покрытых тонким слоем вещества стационарной фазы.

В жидкостно-твердофазном варианте для разделения аналитов поверхность частиц кремния или других материалов используется напрямую. В жидкостно-жидкостном варианте в роли стационарной фазы выступает зак-

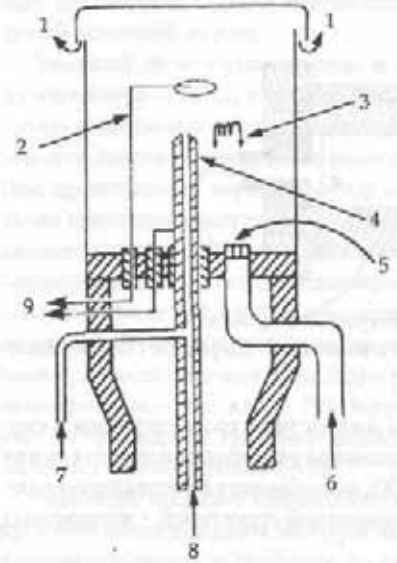


Рис. 20. Схема пламенно-ионизационного детектора:
1. Выход воздуха. 2. Электрод. 3. Элемент накаливания. 4. Сопло. 5. Пористый фильтр. 6. Подача воздуха. 7. Подача водорода. 8.. Приток эффлюента с колонки. 9. К электрометру.

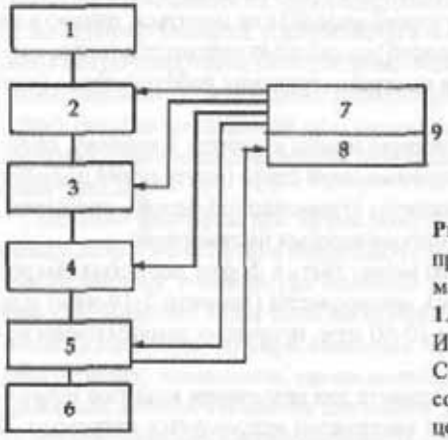


Рис. 21. Схема устройства высокопроизводительного жидкостного хроматографа :
1. Резервуар сольвента. 2. Насос. 3. Инжектор. 4. Колонка. 5. Детектор. 6. Сброс отходов. 7. Управление процессом. 8. Анализ данных. 9. Микропроцессор.

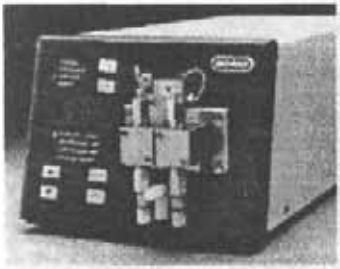


Рис. 22. Насос для автоматической системы высокопроизводительной жидкостной хроматографии («BioRad Laboratories»).

реиленная на частицах жидкость, не смешивающаяся с жидкостью-переносчиком. В современных хроматографах жидкая стационарная фаза связывается с твердыми частицами кремния химическими связями, например, через эфиры кремния или через силиконовые полимерные связи. Такие колонки обладают стабильностью, долговременно работоспособны и обеспечивают хорошее разделение веществ, ионо-обменные операции и т. д.

В широко распространенной **обратно фазной ВПЖХ** используется неполярная стационарная фаза (C_{18}-углеводороды, связанные с частицами кремния, октадецилсиланы), а в качестве подвижной фазы ацетонитрил, алифатические спирты, тетрагидрофуран, вода или их смеси. Для разделения биосоединений часто используется **ионо-парный** вариант обратно-фазной ВПЖХ, в котором в подвижную фазу добавляют ион (для сильных кислот - тетрабутиламмоний фосфат, для сильных оснований - натрий лаурилсульфонат), который образует с ионами биологических соединений нейтральные пары, что позволяет осуществить хорошее разделение молекул биологического происхождения. Для предупреждения прочного осаждения белков из проб на колонке она может быть снабжена защитной предколонкой.

Детекция разделенных компонентов осуществляется в жидкостных хроматографах с помощью проточных фотометрических, флюорометрических или электрохимических устройств (Рис. 23). Результаты разделения компонентов регистрируются графически в виде хроматограммы или могут быть рассчитаны с помощью цифрового интегратора (воспроизводимость ±0,5%).

Оценка хроматографического разделения веществ осуществляется на основе ряда теоретически обоснованных критериев.

а) **Разрешающая способность колонки** - мера степени разделения двух пиков индивидуальных веществ.

Рис. 23. Монитор (а) и электрохимический детектор (б) автоматической системы высокопроизводительной жидкостной хроматографии («BioRad Laboratories»).

$$Rs = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\frac{w_1 - w_2}{2}} = \frac{2t}{w_1 - w_2}$$

где t_{r1} и t_{r2} - это величины времени задержки для двух индивидуальных соединений;

w_1 и w_2 - величины ширины пиков этих веществ, выраженные в единицах времени. По основной линии разделение веществ признается недостаточным при величине $Rs < 0,8$.

б) **Фактор емкости колонки** - отношение числа молекул растворенного веществ на упакованной колонке к числу молекул в подвижной фазе.

$$K' = \frac{tr - tm}{tm}$$

где tr - время задержки изучаемого вещества;

tm - время задержки вещества, не задержанного колонкой (время появления пика сольвента).

Величина K' мала, когда мало молекул вещества оседает на колонке. При $K' < 2$ разрешающая способность колонки слабая. Оптимальные значения K' от 2 до 6; на практике используются колонки с величинами K' от 1 до 10.

в) **Избирательность колонки** - мера относительного отделения центров пиков разделяемых веществ.

$$\alpha = \frac{tr_2 - tm}{tr_1 - tm} = \frac{KX_2}{KX_1}$$

где обозначения аналогичны используемым в предыдущих формулах расчетов, а в числителе всегда большее значение КХ. Этот критерий имеет комплексную основу, зависит от свойств подвижной и стационарной фаз, химических свойств разделяемых веществ и температуры разделения. Лучшее разделение достигается при значении $\alpha > 1,1$.

г) **Эффективность колонки** - узость пиков отдельных веществ. Расчет основан на числе теоретических плато, рассматриваемых как участки колонки с наилучшим уравновешиванием вещества между подвижной и стационарной фазами.

$$N = \frac{t_r}{\sigma}; \qquad N = 5,5\,\frac{t_r^{\,2}}{w^{1/2}}$$

где t_r - время задержки;

σ - четверть ширины пика по основной линии;

$w^{1/2}$ - ширина пика на уровне половины его высоты.

Эффективные колонки имеют величину N, равную или превышающую 5000. Для улучшения разрешающей способности колонки следует добиваться увеличения значений K', а или N, так как

$$Rs = \frac{K'}{K'+1}\;\frac{\alpha - 1}{\alpha}\;\frac{\sqrt{N}}{4}$$

Анализ закономерностей, приведенных выше, подсказывает необходимость комбинированного подхода к изменению условий разделения, включая длину колонки, величину частиц стационарной фазы, скорость движения подвижной фазы для достижения наилучшего результата меньшей ценой.

Разнообразие видов хроматографии: - газовая (подвижная фаза - газ), газо-жидкостная (подвижная фаза - газ, неподвижная - жидкость), жидкостная (обе фазы - жидкости), - позволяет осуществлять разделение широкого круга аналитов: газов, неорганических ионов; аминокислот, сахаров, жиров, витаминов, медикаментов, стероидов; макромолекулярных веществ - белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот, растворимых вирусов; субклеточных компонентов, бактерий. Вследствие этого **хроматография** как мощное аналитическое средство для разделения, детекции и количественной оценки может довольно широко применяться в клинической лабораторной аналитике.

III. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ БИОМАТЕРИАЛОВ

ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Многие определения в клинической лабораторной диагностике основаны на измерении лучистой энергии, испускаемой, поглощаемой, рассеиваемой или отражаемой в определенных условиях.

Природа света

Понятие «электромагнитное излучение» относится ко всем видам лучистой энергии – гамма - и рентгеновскому излучению, ультрафиолетовому, видимому и инфракрасному свету, а также к радиоволнам. Самая короткая длина волны и соответственно самые большие кванты у гамма-лучей, испускаемых радиоактивными веществами, самые длинные волны, и соответственно самые малые кванты - у радиоволн. Светом обычно называют ту область лучистой энергии, которая видна человеческим глазом, распространяя это понятие на близлежащие области ультрафиолетового и инфракрасного света.

Медицина для разных целей использует практически все доступные диапазоны лучистой энергии, однако клиническая лабораторная диагностика оперирует более узкой областью, чаще всего только видимым светом, реже ультрафиолетовым и очень редко инфракрасным или областью радиочастот. Однако техника развивается очень быстро, появляется все больше работ по использованию ближней инфракрасной области, главным образом для прижизненной (неинвазивной) диагностики у новорожденых, а также по магнитной резонансной спектроскопии (МАС), которая является спектроскопией в области радиочастот.

Лабораторные специалисты обычно выражают длину волны света в метрических единицах - нанометрах

1 нм = 1 миллимикрон = 10 ангстрем = 10^{-9} м = 10^{-7} см

Физики-спектроскописты чаще используют волновые числа, которые выражают в $см^{-1}$ (обратных сантиметрах).

$$1\ см^{-1} = \frac{10000}{\text{длина волны в нанометрах}}$$

Человеческий глаз различает (видит) лучистую энергию в диапазоне от примерно *380 до 750 нм, при помощи приборов можно измерить свет и* в более коротковолновой (ультрафиолетовой) и в более длинноволновой (инфракрасной) области спектра. Солнечный свет - это смесь различных длин волн, которые человеческий глаз воспринимает как белый. Различные цвета представляют собой компоненты солнечного света, соответствующие отдельным участкам его спектра (табл. 3).

Таблица 3

Спектр солнечного света

Длина волны	Название диапазона	Воспринимаемый глазом цвет
< 380 нм	*ультрафиолетовый*	*невидим*
380-440 нм	видимый	фиолетовый
440-500 нм	видимый	голубой
500-580 нм	видимый	зеленый
580-600 нм	видимый	желтый
600-620 нм	видимый	оранжевый
750 нм	видимый	красный
750-4000 нм	ближний инфракрасный	невидим
4000-20000 нм	дальний инфракрасный	невидим

Фотометрические и спектрофотометрические методы

Основные положения.

Фотометрия - измерение количества поглощенного света, независимо от длины волны. В клинической лабораторной диагностике практически используются только узкие полосы - определенные диапазоны длин волн - , выделенные при помощи светофильтров (фильтровые фотометры) или с помощью более сложных устройств - призм или решеток или их комбинаций (спектрофотометры). В этом случае светопоглощение, связанное с присутствием исследуемого вещества, должно быть значительно выше «фона», т.е. светопоглощения на данной длине волны в его отсутствие.

Поглощение света прозрачными растворами подчиняется закону Ламберта -Бера, который является теоретической основой всех количествен-

ных фотометрических измерений. Часть света, которая падает на оптическую среду (например, раствор исследуемого вещества) отражается, другая поглощается или рассеивается, а остальное проходит насквозь. Если интенсивность падающего света обозначить Io, интенсивность отраженного Ir, поглощенного Ia, расеянного Id, а прошедшего It, то:

$$Io = Ir + Ia + Id + It$$

Если концентрацию исследуемого вещества определяют фотометрическим методом, то подбирают такие условия, в которых отраженным и рассеянным светом можно пренебречь, поэтому количество прошедшего света равно количеству падающего за вычетом поглощенного.

Отношение интенсивностей прошедшего через среду света и упавшего на нее It/Io называется соотношением прозрачности данной среды или ее проницаемостью, обычно обозначается T (transmision) и выражается в процентах. Чем меньше It при одинаковой Io, тем меньше T, т.е. проницаемость убывает, когда толщина слоя увеличивается. Ламберт (Lambert, 1760) нашел, что это убывание идет по экспоненте - между интенсивностью прошедшего света и толщиной слоя имеется логарифмическая зависимость:

$$It = Io * e^{-k*l}$$

где: l - толщина слоя,

k -постоянная, характерная для данной оптической среды, она имеет размерность см ^{2}моль$^{-1}$

e - основание натуральных логарифмов.

Аналогичная зависимость имеется и между поглощением света и концентрацией окрашенного вещества в растворе. Бер (Beer, 1852) сформулировал понятие оптической плотности и установил эту зависимость: оптическая плотность цветного (окрашенного) раствора прямо пропорциональна его концентрации (имеется в виду, что толщина слоя одинакова):

$\log Io/It = K*c$

$\log Io/It$ - оптическая плотность раствора,

K - коэффициент,

c - концентрация вещества.

Оптическую плотность (ОП) называют также экстинкцией и обозначают латинской буквой E, или абсорбцией и обозначают буквой A. Комбинированный закон Ламберта-Бера имеет вид:

$E = \log Io/It = K*l$,

т.е. оптическая плотность раствора пропорциональна длине оптического пути и концентрации окрашенного вещества.

По традиции коэффициент оптической плотности или экстинкции K предполагает, что вычисления проводятся в десятичных логарифмах, в то время, как постоянная k в законе Ламберта, связывающего толщину слоя и поглощение, предполагает использование натуральных логарифмов, поэтому K = 0,43429 k

Закон Ламберта-Бера предполагает, что свет монохроматичен, т.е. имеет одинаковую длину волны, и раствор физически однороден, т.е. прозрачен, в нем нет преломляющих и рассеивающих свет частиц. Если же свет не монохроматический, т.е. состоит из пучков разной длины волны, то для каждого из этих пучков будет своя собственная величина коэффициента K, приведенная выше формула оказывается неверной - прямой пропорциональности между поглощением света, концентрацией окрашивающего вещества и длиной оптического пути нет. Также точно, формула не пригодна для того случая, когда среда неоднородна - в растворе есть рассеивающие частицы, коэффициент преломления которых отличен от коэффициента преломления раствора.

Таблица 4

Основные понятия фотометрии

Название	*Символ*	*Определение*	*Синоним*
Пропускание	T%, T	It/Io	
Абсорбция	A , E	2- log T	оптич.плотн.
экстинкция			
Коэффициент	K		
экстинкции			
Длина пути	l	определяется	
света		размером кюветы	
Толщина слоя	a	- « -	
Концентрация	c		
Молекулярная			
поглощающая			
спообность	e (эпсилон)	A/ac (моль/м^3)	
единица длины волны	l (ламбда)	нм = 10^{-9} м	
обратный сантметр	см$^{-1}$	10000 / l	
максимум абсорбции	lmax	длина волны при которой максимум поглощения света	

В системе СИ молекулярная поглощающая способность е - выражается в моль/м^2, т.е. в величине оптической плотности, которой обладал бы раствор, на 1 квадратный метр поверхности которого приходится 1 моль вещества. Практически величина эта неудобна, поэтому часто используют другое определение - оптическую плотность раствора толщиной 1 см, в котором концентрация исследуемого вещества составляет 1 г/100 мл (1%) при выбранных значениях длины волны, температуре и pH. Ее обозначают $A_{1см}^{1\%}$. (абсорбционный коэффициент).

Фотометрическое измерение возможно, только если существует прямая пропорциональность между абсорбцией и концентрацией, что может быть установлено экспериментально для данного прибора и данных условий измерения. Часто линейная зависимость - т.е. соответствие закону Бера, имеет место лишь на определенном участке калибровочного графика, например, в его начале, до определенной концентрации. Для этого диапазона константа калибровки может быть выведена из формулы:

$E = K * c * l$ или $c = E/K * l$

т.к. l и K в данном случае постоянны, их можно заменить параметром $A = 1/K*l$, который называют фактором расчета. В этом случае формула упрощается:

$c = A * E$

Чтобы вычислить величину A, проводят калибровку - измеряют оптические плотности (E) нескольких растворов с известными концентрациями (c) и сопоставляют полученные значения E и c. Если они пропорциональны друг другу, говорят, что калибровочный график линейный и приведенной выше формулой можно пользоваться. Если же пропорциональности нет, говорят, что зависимость нелинейная, закон Ламберта-Бера к данным условиям не применим.

Закон Ламберта-Бера лежит в основе всех методов колориметрии и фотометрии, независимо от того, в какой области спектра - видимой, ультрафиолетовой или инфракрасной - выполняется измерение, а также от того, каким способом измеряется интенсивность светового потока и как проводится расчет: по данным измерений на одной или нескольких длинах волн.

Колориметрия - измерение интенсивности цвета раствора неизвестной концентрации путем сравнения его с интенсивностью цвета стандартного раствора. Она предполагает, что толщину слоя одного из этих растворов изменяют, пока не будет достигнуто визуальное (видимое на глаз) равенство окрасок.

Фотометрия предполагает измерение интенсивности света, прошедшего через раствор. Она может выполняться в разных вариантах: если имеется возможность выделять только один или несколько фиксированных спектральных интервалов с помощью светофильтров, то говорят о *фильтровом фотометре*, если имеется монохроматор - устройство позволяющее выделять пучок света с любой длиной волны в данном диапазоне, то говорят о *спектрофотометрии* ,

Фотометрия может выполняться по *однолучевой* или *двулучевой* схеме. В первом случае с помощью фотоприемника (фотодетектора, сенсора) измеряют интенсивность светового потока в отсутствии кюветы с исследуемой пробой или когда она заменена кюветой с растворителем (холостой опыт или по английски «blanc»), затем ставят кювету с исследуемым раствором и снова измеряют количество прошедшего света и вычисляют величину оптической плотности по приведенной выше формуле (Рис. 24). В зависимости от конкретной конструкции прибора расчет выполняется встроенной микросхемой или же по специальной шкале. Таким образом, фоновое измерение (холостой опыт) и опытное разнесены во времени, что может быть причиной ошибок, если источник света не стабилен.

В *двулучевом методе* оба измерения выполняются одновременно. Это достигается тем, что источник света генерирует два луча одинаковой интенсивности, один из них проходит через опытную пробу (исследуемый раствор), другой через пробу сравнения (холостую пробу, обычно один растворитель), затем их интенсивности сравниваются (Рис.25). Сравнение может осуществляться механически, в этом случае пучок света после пробы сравнения проходит через отверстие дифрагмы, сужая которое, добиваются равенства интенсивностей обоих пучков. Диафрагма приводится в движение барабаном, который обычно градуируется непосредственно в величинах оптической плотности. Судить о том, что насту-

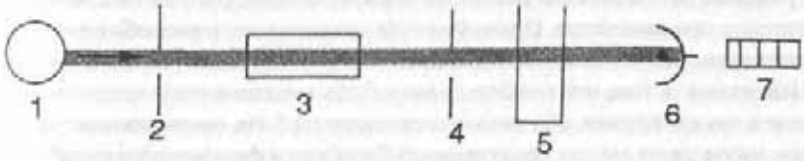


Рис. 24. Схема однолучевого спектрофотометра.
1. Источник света. 2. Щель на входе. 3. Монохроматор. 4. Щель на выходе. 5. Кювета. 6. Детектор. 7. Измерительное устройство.

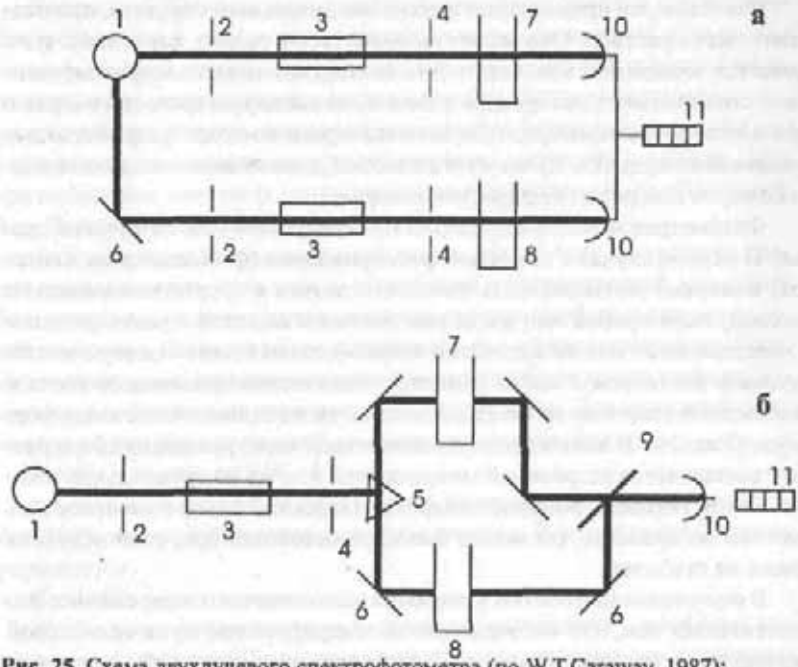


Рис. 25. Схема двухлучевого спектрофотометра (по W.T.Caraway, 1987):
а. Спектрофотометр с пространственным разделением лучей света. **б.** Спектрофотометр с разделением лучей света по времени. **1.** Источник света. **2.** Щель на входе. **3.** Монохроматор. **4.** Щель на выхоле. **5.** разделитель луча света. **6.** Зеркало. **7.** Кювета с пробой. **8.** Кювета с референтным раствором. **9.** Шоппер. **10.** Детектор. **11.** Измерительный прибор.

пило равенство обоих пучков света можно разными способами: на глаз оценивая различие освещенности двух половин поля зрения, либо электрически, добиваясь равенства фототоков, о чем судят по положению стрелки гальванометра. Преимущество механического способа в его надежности, результаты мало зависят от капризов электрической сети. Недостаток в том, что прибор должен быть механически хорошо отлажен и отъюстирован, оба потока света должны быть очень равномерными, иначе связь между градуировкой барабана и фактическим ослаблением пучка света нарушается.

В настоящее время механические устройства практически вышли из употребления. Благодаря успехам электроники и вычислительной тех-

ники на новых приборах устанавливаются встроенные электронные микросхемы, которые дают возможность считывать результаты непосредственно в единицах оптической плотности, если надо, сразу же пересчитывать их в концентрации и передавать в компьютер или распечатывать на бумаге. Однако принципиальное различие между одно- и двулучевой схемой остается, каждая из них имеет свои преимущества и недостатки. В двулучевой схеме значение фона вычитается автоматически, в ней легче добиться стабильности результатов измерения во времени (устранить дрейф нуля), но все ошибки и помехи, возникшие в канале сравнения (например, опалесценция раствора или появление в нем пузырьков) сказываются и на результатах опыта.

Спектрофотометрия - метод качественного и количественного анализа веществ, основанный на измерении спектров поглощения. Может рассматриваться как вид абсорбционного фотометрического анализа для измерения оптической плотности (Е) или процента пропускания света (Т%).

Устройство фотометрических приборов

Любой фотометрический прибор, будь то самый простой гемоглобинометр или совершенный спектрофотометр, имеет одинаковые элементы: источник света, монохроматическое устройство, кюветное отделение, фотоприемник.

Источник света зависит от рабочего диапазона. В качестве источника ультрафиолетового света (с длиной волны короче 400 нм), обычно используется дейтериевая лампа, источником видимого света служит ксеноновая лампа, а лампа накаливания дает видимое и инфракрасное излучения. Эти лампы дают непрерывные спектры, из которых с помощью монохроматора или светофильтра выделяют нужные спектральные участки. Иногда используют ртутные лампы, которые дают линейчатые спектры, соответствующие спектральным линиям ртути. В этом случае нет возможности выбрать оптимальную для данного метода длину волны, а приходится делать измерения наиболее близкой к ней линии ртути.

Самый простой, и поэтому наиболее распространенный источник света - это лампа накаливания. Спектр ее излучения зависит от температуры - *чем она выше, тем больше интенсивность фиолетовой компоненты.* В клинико-биохимических исследованиях часто используются методы, основанные на так называемом оптическом тесте Варбурга - определении НАД.Н и НАДФ.Н по поглощению при длине 340 нм, т.е. уже в ультрафиолетовой области. Поскольку удобно, чтобы в приборе был один,

общий для всех диапазонов источник света, используются лампы накаливания, работающие с перекалом или галогеновые лампы. Это позволяет обойтись одним дешевым источником света, но сопряжено с тем неудобством, что возникает сильное тепловое излучение.

Отведение тепла, выделяемого мощным источником света - лампой накаливания или ксеноновой лампой - большая проблема для конструктора фотометрического прибора. Если светофильтр находится сразу после источника света, до кюветы с пробой, он нагревается, что в конечном итоге может привести к его порче. В другом варианте - когда все излучение от источника попадает на пробу, а только затем уже отфильтровывается нужный участок спектра, приводит к тому, что нагревается кювета с пробой, что может сказаться на интенсивности цветной реакции, особенно ферментативной, и привести к образованию пузырьков, создающих помехи при измерении.

В последнее время все более широкое применение, особенно в приборах, созданных для решения конкретных аналитических задач (гемоглобинометры, нефелометры), находят светодиоды - полупроводниковые устройства, излучающие монохроматический свет. Это важное преимущество, поскольку отпадает необходимость в светофильтре, кроме того светодиод не нагревается во время работы.

Монохроматоры (выделение области спектра).

Поскольку для разных веществ характерно поглощение света на разных длинах волн, в приборах для фотометрии -фотометрах и спектрофотометрах - обязательно есть оптические средства для выделения определенных интервалов и длин волн света. Желательно, чтобы этот интервал соответствовал полосе поглощения исследуемого вещества, но практически это не всегда полностью осуществимо.

Природная (подлинная) ширина полосы адбсорбирующего вещества определяется как полоса абсорбции в пике, равная 1/2 максимума абсорбции. Общее правило - чтобы пик абсорбции был в пределах 99.5% истинной величины ширины полосы пропускания и его ширина не должна превышать 10% от природной ширины полосы.

Большинство методов клинической химии используют реакции, в результате которых образуются окрашенные продукты с шириной полосы пропускания от 40 до 200 нм. Так, НАД.Н имеет природную ширину полосы 58 нм (lmax = 339 нм). Для точного измерения количества этого вещества нужно выделить спектральный участок шириной 6 нм или меньше, если же ширина полосы 10 нм (на длине волны 340 нм), абсор-

ция составляет примерно 98% полосы от величины, полученной с разрешением (шириной) 1 нм.

Нужные спектральные участки (полосы) обычно выделяются с помощью светофильтров, призм и диффракционных решеток. Самый простой и дешевый, поэтому наиболее распространенный способ, это использование светофильтров. В приборах старой конструкции в качестве светофильтров используются цветные стекла, но в последнее время их вытесняют интерференционные светофильтры, которые позволяют выделять полосы по 5-10 нм, в то время как для стеклянного фильтра полоса 50 нм уже очень большое достижение. Характеристика фильтра - это ширина полосы пропускания в нанометрах, через которую проходит половина света.

Призмы из стекла (для видимой области) или кварца (для ультрафиолета) позволяют исследовать непрерывный спектр, их особенность большая неравномерность по длинам волн - в области коротких волн они позволяют выделять значительно более узкие (монохроматичные) пучки, чем в области длинных.

Диффракционная решетка представляет собой зеркало, на поверхности которого нанесены параллельные штрихи (несколько сот штрихов на миллиметр), что обеспечивает диффракцию, поэтому под определенным углом отражается только свет соответствующей длины волны. Преимущество диффракционной решетки по сравнению с призмой это более равномерное разрешение по длинам волн, линейная дисперсия на всем диапазоне видимого и ультрафиолетового спектра.

Тип монохроматора выбирается в соответствии с целями анализа. Так, для пламенной фотометрии используют светофильтры с узкой полосой пропускания, что позволяет лучше выделять пики. В биохимическом анализе узкая полоса светофильтра не так обязательна, поскольку полосы поглощения для большинства цветных реакций широкие. В то же время, чем шире выделяемый участок спектра, тем больше проходит света, тем проще решать другие проблемы конструкции прибора.

В настоящее время большинство фотометров и биохимических автоанализаторов, имеющихся в КДЛ, используют интерференционные светофильтры. Работая с ними, нельзя забывать два обстоятельства: во-первых, что со временем они стареют, теряя свои оптические характеристики, и во-вторых, что они выделяют очень узкие пучки света, поэтому важно убедиться, что длина волны соответствует пику поглощения окрашенного продукта. Может случиться, что два внешне одинаковых ин-

терференционных светофильтра, оба, допустим, для зеленой области, на самом деле пропускают свет с разными длинами волн.

У спектрофотометра с непрерывным спектром - как призменного, так и диффракционного, обязательно имеется щель - устройство, которое выделяет свет с определенной длиной волны. Чем шире щель, тем шире пучок света, тем больше лучистой энергии попадает на приемник. Сделав щель слишком широкой, можно выйти за пределы, в которых действует закон Ламберта-Бера, в то же время, если она слишком узкая, в приемник попадает мало лучистой энергии, что сказывается на точности измерения. Практически надо искать компромисс между этими крайностями. В силу того, что спектральное разрешение спектрофотометра зависит от длины волны, в разных спектральных участках оптимальны разные ширины щелей. Как уже указывалось выше, в больших спектрофотометрах существуют так называемые «щелевые программы», которые обеспечивают для каждой длины волны автоматический выбор рекомендованной ширины щели.

Кюветы и кюветные отделения. Фотометрируемый раствор помещается в кювету из прозрачного материала, которая устанавливается в кюветодержателе кюветного отделения. Обычно используют кюветы квадратного сечения с длиной оптического пути 1 см, реже 0,5 или 0,3 см. Кюветы делают из кварца - они пригодны для измерений по всему диапазону длин волн или из стекла - для видимого света и ближнего ультрафиолета. Выпускаются также разовые пластмассовые кюветы, которые могут быть использованы не только для фотометрии, но и в качестве пробирок для выполнения подготовительных операций.

Широкое распространение имеют проточные кюветы, которые обычно имеют устройство, позволяющее автоматически или полуавтоматически заполнять их до определенного уровня. Это очень облегчает и ускоряет работу, особенно если фотометр соединен с печатающим устройством или напрямую связан с компьютером.

Большинство современных фотометров и спектрофотометров имеют термостатированные кюветные отделения или блоки, что позволяет проводить измерения при фиксированной температуре, что особенно важно для кинетического определения активности ферментов. Чаще всего термостатирование обеспечивает температуру 25 °С или 37 °С, но возможны и другие варианты.

Приемники излучения.

В качестве фотоприемников для видимой и ультрафиолетовой областей используются, главным образом, вакуумные фотоэлементы, реже

фотоумножители, для инфракрасной области фотосопротивления. На старых приборах, многие из которых эксплуатируются и сейчас, используется компенсационная схема измерения - либо оптическая, либо электрическая. В случае оптической схемы, вращая барабан, связанный с диафрагмой, добиваются равенства световых потоков, в случае электрической схемы, вращая ручки потенциометра, добиваются электрической компенсации фототока. И в том, и в другом варианте о наступлении момента компенсации судят по показаниям индикатора на панели прибора. Отсчет делается по положению барабана или ручек потенциометра.

В *выпускаемых ныне приборах практически всегда световой поток* вызывает пропорциональный его интенсивности фототок, который измеряется цифровым вольтметром, вся дальнейшая обработка информации выполняется в цифровой форме. Так как величина оптической плотности связана с сигналом, поступившим от фотоэлемента, логарифмической зависимостью, точность фотометрии зависит от ряда причин, которые подробнее разобраны в разделе «оптимизация фотометрии».

Методы измерений оптической плотности

Как правило, для фотометрии выбирается та область спектра, где поглощение максимально, обычно это увеличивает точность количественного измерения и повышает его чувствительность. Однако, с другой стороны, оптическая плотность не должна быть слишком большой, иначе количество прошедшего света мало, соответственно падает и становится ненадежным сигнал фотоприемника. Кроме того, длина волны выбирается так, чтобы по-возможности уменьшить интерференцию (мешающее влияние) посторонних веществ.

Так, щелочной пикрат при определении креатинина имеет пик в видимой области при 480 нм, но реактив сравнения (холостой опыт) сильно абсорбирует свет с длиной волны менее 500 нм, поэтому для измерения выбирается светофильтр 520 нм, что уменьшает влияние холостой пробы, улучшает точность и правильность результата.

Желательно, чтобы в выбранном для измерения спектральном участке кривая была по-возможности горизонтальной, тогда некоторая немонохроматичность измерительного пучка мало сказывается на результатах. Если же она приходится на «склон» пика, то оказывается, что внутри данного пучка одни участки сильно поглощают свет, другие мало, это приводит к тому, что закон Ламберта-Бера не выполняется.

Основной способ устранения мешающего влияния посторонних веществ и факторов (интерференции) - это вычитание значения холостой пробы из опытной, или на лабораторном жаргоне «фона». Обычно холостую пробу готовят так же, как и исследуемую (опытную), с той разницей, что в нее не добавляют анализируемый материал. Можно независимо измерить экстинкции опытной (Еоп) и холостой (Ефон) проб, а затем вычесть одну из другой, либо установить начальную точку отсчета фотометра (100% пропускание, I0) по холостой пробе. Первый способ более трудоемок, но имеет то преимущество, что необычное отклонения фона, которое может быть признаком неправильного выполнения методики, бросается в глаза.

Измерения при нескольких длинах волн. Интерференцию вследствие попадания загрязнений, небольшой мутности и царапин на стенках кюветы можно исключить или, во всяком случае, уменьшить, измеряя оптическую плотность на 2 или 3 длинах волн. По существу, это шаг в сторону хемометрии - высокотехнологического метода, который предполагает измерение на многих длинах волн и компьютерную обработку результатов, с тем, чтобы вычленить небольшой полезный сигнал на фоне многочисленных помех.

В двухволновом методе измерения делают на максимуме пика и на уровне его основания, полагая, что помехи любого рода в равной степени сказываются и на поглощении света, и на той и на другой длине волны, а исследуемое вещество специфически поглощает только на одной из них. Это так называемый бихроматический анализ, который широко применяется во многих приборах.

В трехволновом методе пытаются «угадать», какой была бы оптическая плотность раствора, если бы в нем не было исследуемого вещества. Для этого делают два измерения: одно до начала пика, а другое после него, на соединяющей их прямой находят то место, которое соответствует пику, и эту величину вычитают из опытной пробы (рис. 26). При определении гормонов применяется так называемая поправка или коррекция Аллена: делают три измерения на длинах волн 280, 300 и 320 нм, «корреглированную» абсорбцию вычисляют по формуле:

$$A_{кор} = A_{300} - (A_{280} + A_{320})/2$$

Оптимизация фотометрии

Если, как это сейчас бывает в большинстве случаев, для работы используются наборы реактивов заводского изготовления, то возможности лабораторного специалиста выбирать оптимальный вариант исследо-

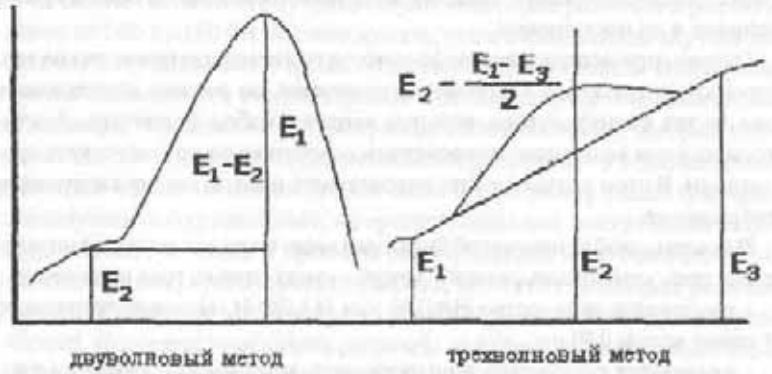


Рис. 26. Схема измерений при двуволновом и трехволновом методах.

вания ограничены, однако, в определенных пределах, особенно при ручном выполнении анализов, такая возможность остается. Чтобы получить максимально возможную точность результата, надо выбрать такие условия фотометрии, в которых фотометр, как прибор, работает точнее всего. *Для этого надо представлять себе природу возможных ошибок и пути их* устранения. Большинство возможных погрешностей связаны с самой природой фотометрического анализа, который в идеальном случае предполагает использование абсолютно монохроматического пучка света, т.е. такого света, все компоненты которого в одинаковой мере поглощаются исследуемым раствором. Только в этом случае приведенный выше закон поглощения света (Ламберта-Бера) справедлив. Если же свет не монохроматический, т.е. одни его компоненты поглощаются больше, другие меньше, то оказывается, что при большой концентрации, когда оптическая плотность велика, специфический свет почти полностью поглощается, а неспецифичный проходит, создавая «подсветку». Фотоприемник, не имея возможности дифференцировать эти пучки света, выдает суммарную величину, которая зависит уже не столько от концентрации исследуемого вещества, сколько от величины «подсветки».

По этой причине желательно выбрать для измерения такой участок спектра, на который приходится пик поглощения окрашенного вещества, заведомо перекрывающий спектральную ширину пучка света, используемого для измерения. Если измерения выполняются на хорошем спектрофотометре, такой участок выбрать несложно, достаточно снять спектры поглощения холостой и опытной проб и убедиться в том, что длина

волны, рекомендованная автором методики, совпадает с максимумом различия в их поглощении.

Однако, при использовании фотометра со светофильтрами это не так. Возможности маневра лаборанта ограничены, он должен использовать один из тех светофильтров, которые входят в набор фотометра, фактически не имея возможности проверить, насколько он соответствует требованиям. В этом случае можно посоветовать полагаться на следующие соображения.

В современной клинической биохимии чаще всего используется определенная цепь химических реакций, которая имеет одно из трех окончаний:

- измеряется количество НАД.Н или НАДФ.Н, которые поглощают на длине волны 340 нм,
- измеряется количество *п*-нитрофенола, который поглощает на длине волны 405 нм,
- измеряется интенсивность красного окрашивания, которое развивается при окислении аминофенолов перекисью водорода.

В первых двух случаях длина волны света для большой группы методик одинакова, практически все фильтровые фотометры снабжены нужными светофильтрами, способными достаточно избирательно выделить нужный спектральный участок. Пользователя может беспокоить только качество конкретного светофильтра. Дело в том, что во многих приборах светофильтр установлен до кюветы, непосредственно около яркого источника света. Во время работы он нагревается и со временем «выгорает», его спектральная избирательность нарушается, причем проверить это в условиях клинической лаборатории практически невозможно - только иногда на глаз в нем видны подозрительные пятна или точки. Оценить пригодность светофильтра может только организация, обеспечивающая сервисное обслуживание, если у нее есть соответствующий метрологический сертификат, или местное метрологическое учреждение.

Если фотометрируется раствор красного цвета (т.е. измерение проводится в зеленом свете), ситуация несколько сложнее. При определении органических соединений - глюкозы, холестерина и др. - почти всегда речь идет об измерении количества образовавшейся на предыдущих этапах анализа перекиси водорода. В присутствии фермента пероксидазы она окисляет ароматические амины с образованием окрашенных в красный цвет соединений. Субстраты химической реакции могут несколько различаться по строению, что сказывается как на чувствительности реакции (интенсивности окраски), так и на оптимальной для фотометрии

длине волны света. Поэтому существуют некоторые различия в рекомендациях от 500 до 560 нм. Можно думать, что в большинстве случаев эти различия несущественны, однако это нельзя гарантировать. Если исследование выполняется на фильтровом фотометре (или биохимическом анализаторе, снабженном фотометром со светофильтром), который изготовлен той же фирмой, которая поставляет реактивы, то о соответствии длин волн можно не беспокоиться. Если же фотометр одной фирмы, а используется набор реактивов, не предусмотренный инструкцией к прибору, работая с зеленым и красным светофильтром надо быть очень осторожным, и в первую очередь проверить, та ли это химическая реакция, которую рекомендует изготовитель прибора. Если используется другой субстрат, то прежде, чем начать работать, надо самым тщательным образом проверить линейность калибровки.

При анализе неорганических соединений - железа, кальция, фосфора, магния -используется широкий круг химических реакций, в которых образуются самые различные окрашенные продукты. Хотя визуально иногда кажется, что цвет развившейся окраски тот же, однако при спектральном анализе различия могут быть очень большими, самостоятельно подбирая светофильтр, надо быть очень осторожным. Можно рекомендовать прежде всего построить калибровочные графики для нескольких разных светофильтров и выбрать тот из них, где чувствительность наибольшая, т.е. оптическая плотность изменяется больше всего. В то же время холостая проба (т.е. чистый реактив) должна иметь минимальную оптическую плотность и рабочий диапазон должен быть при величинах оптической плотности не более, чем 0.6-0.7, так как при более высоких значениях точность работы заметно падает.

В силу того, что оптическая плотность- это логарифм отношения падающего света к прошедшему, а в опыте измеряется именно количество прошедшего света, в разных диапазонах оптической плотности точность ее измерения оказывается неодинаковой, даже если приемник работает совершенно одинаково. Так, если интенсивность падающего света (т.е. холостой пробы) составляет 1000 единиц, а оптическая плотность 1.0, это означает, что в опыте на приемник падает свет интенсивностью в 100 единиц (10% от падающего). Если измерение выполняется с точностью 1% от падающего света, значит, прибор улавливает различия между 90 и 100 единицами, что в переводе на язык оптических плотностей составляет 41 тысячную. Если же оптическая плотность 0.3, то, согласно закону Ламберта-Бера, исследуемый раствор поглощает только половину па-

дающего света и на приемник попадает свет интенсивностью в 500 единиц. Измеряя его с точностью 10 единиц, можно уловить различие между интенсивностями 500 и 510 единиц, что в пересчете на единицы оптической плотности составляет 0.300 и 0.309, т.е. измерение выполняется с точностью 9 тысячных, что в 4.5 раза точнее.

В таблице 5 приведены расчетные данные того, с какой точностью измеряется оптическая плотность в различных диапазонах ее значений в том случае, когда сила света измеряется с точностью в 1% от интенсивности падающего света.

Таблица 5

Расчет точности измерения оптической плотности

Оптическая плотность	Точность измерения ОП в тысячных единицы ОП
2	301
1.3	79
1.0	41
0.9	33
0.8	27
0.7	21
0.6	17
0.5	14
0.4	11
0.3	9
0.2	7
0.1	5

При налаживании методики анализа очень важно выбрать условия измерения, обеспечивающие максимальную точность. Если рассматривать только один этап - фотометрию, то здесь надо учитывать влияние двух противоположных влияний. Окончательный результат получается путем умножения оптической плотности на фактор расчета. Чем меньше величина этого фактора, тем в меньшей степени ошибка определения ОП сказывается на окончательном результате, поэтому желательно фактор уменьшить, чего можно достигнуть, увеличив количество исследуемого материала, которое берется в пробу. Однако, при этом возрастает и оптическая плотность, которая, как уже отмечалось, в разных диапазонах измеряется с разной точностью. Из приведенной таблицы 5 видно, что если условия анализа выбраны так, что оптическая плотность около

0.1, то, удвоив количество биоматериала, мы будем работать в диапазоне ОП около 0.2, соответственно в два раза уменьшится фактор расчета. Ошибка же измерения ОП также увеличится, но значительно меньше, чем в два раза - от 5 до 7 тысячных. Поэтому такое изменение режима работы оправдано, тем более, что при этом уменьшится и ошибка, связанная с отмериванием биоматериала. В другом же диапазоне значений эффект может получиться обратным, поэтому подбирая условия анализа, надо обязательно учесть все обстоятельства.

Несколько сложнее выбрать оптимальные условия для двухволновой фотометрии, т.е. когда измерения выполняются на двух длинах волн, а для расчета используется разность их значений. Необходимость в этом возникает, если исходный биологический материал опалесцирует (например, если сыворотка хилезная) или когда надо вводить поправки на неспецифические мешающие вещества, или же когда многократно используется пластмассовая посуда и надо вводить поправку на качество кюветы. Во всех этих случаях надо оценить, насколько оправдано двухволновое измерение, т.е. что больше: ошибка, которая вносится при дополнительном измерении, или же погрешность, которую мы хотим исправить. Решение вопроса основывается на принципах, изложенных в разделе об использовании статистических методов в клинической лабораторной диагностике. В данном случае различия между повторными измерениями одной и той же пробы (хотя они и выполнены на разных длинах волн), рассматриваются как внутрииндивидуальный разброс, а различия, вызванные влиянием мешающих факторов, рассматриваются как межиндивидуальный разброс. Если внутрииндивидуальная дисперсия меньше, чем межиндивидуальная, то измерение на второй длине волны и внесение соответствующей поправки оправдано, если же межиндивидуальная меньше внутрииндивидуальной, то такое усложнение анализа бессмысленно.

Поясним это на примере. Допустим кто-то, кто сомневается в качестве используемых кювет, захочет проверить обоснованность своих подозрений. Для этого ему можно рекомендовать взять серию кювет и заполнить их одной и той же жидкостью, а затем каждую кювету многократно фотометрировать на обеих выбранных длинах волн (табл. 6 и 7).

Для каждой кюветы вычисляются средняя величина и дисперсия измерений (в таблицах 6 и 7 это два последних столбика), вычисляются средняя величина дисперсий (в таблице 6 она 13,6, в таблице 7 - 13,2) и дисперсия средних величин кювет (в таблице 6 она 162,3, в таблице 7-161,9). Если дисперсия средних величин (т.е. между кюветами) больше,

Таблица 6

Результаты измерений оптической плотности на основной длине волны

№ кюветы	*измерения* 1	2	3	4	5	6	7	8	9	*среднее*	*дисперсия*
1	419	414	420	422	432	420	421	421	420	420,3	26,0
2	427	427	429	429	429	428	428	428	427	428,0	0,7
3	428	434	443	442	441	439	439	438	438	438,0	18,7
4	434	433	435	436	435	437	436	436	436	435,3	4,3
5	430	432	433	439	444	439	440	440	440	437,4	19,1
6	429	426	437	437	436	434	433	434	433	432,2	12,0
7	460	461	466	467	464	454	454	454	453	459,2	28,2
8	449	452	455	456	455	447	447	446	448	450,6	14,0
9	457	457	462	461	460	460	459	459	458	459,2	2,6
										среднее проб - 440,1	13,6

дисперсия между кюветами - 162,3

Таблица 7

Результаты измерений оптической плотности на вспомогательной длине волны

№ кюветы	*измерения* 1	2	3	4	5	6	7	8	9	*среднее*	*дисперсия*
1	220	222	213	213	214	221	232	220	221	220,3	26,0
2	229	226	227	229	228	228	227	230	229	228,1	1,4
3	233	239	242	243	240	240	238	239	239	239,2	7,1
4	232	231	234	235	236	235	236	235	234	234,2	2,6
5	232	230	238	233	239	245	240	241	240	237,6	21,4
6	226	224	237	236	237	233	234	234	233	232,7	19,1
7	259	260	266	267	263	254	255	254	253	259,0	25,8
8	251	249	256	255	247	255	246	247	248	250,4	13,8
9	261	258	257	258	261	258	260	260	259	259,1	1,9
										среднее - 240,1	13,2

дисперсия между кюветами 161,9

чем дисперсия измерений одной и той же кюветы, то двухволновой метод оправдан, в противном случае он бессмысленен. В данном примере разброс результатов измерений в разных кюветах (дисперсия между кювета-

ми) составила для основной длины волны 162,3 тысячных долей ОП, а для вспомогательной длины волны была практически такой же: 161,9.

В то же время точность самой фотометрии была значительно лучше - средняя дисперсия результатов повторных измерений одной и той же кюветы составила 13,6 и 13,2 тысячных. Таким образом двухволновый метод оправдан - делая два измерения, мы добиваемся компенсации различий между кюветами, которые значительно больше, чем различия между результатами повторных измерений одной и той же пробы.

Такой статистический подход, как и все статистические подходы, оправдан в среднем, в данном примере, когда кюветы неоднородные. Однако, может быть и другая постановка вопроса - хилезные сыворотки встречаются относительно редко, нужно ли всегда делать дополнительное измерение и вводить поправку на хилезность? На этот вопрос заранее ответить нельзя, каждая лаборатория должна решать его самостоятельно.

Стандартизация фотометрических приборов.

Метрологические характеристики фотометрических приборов должны проверяться метрологами и оформляться в виде паспортов приборов. Однако, если для расчета используется не калибровка, а известные, проверенные и опубликованные в печати константы, в лаборатории может возникнуть необходимость самостоятельно стандартизовать фотометр или спектрофотометр. Так, при определении ферментов с использованием НАД расчет проводится по данным молекулярной адсорбции, которая при нейтральном pH и длине волны 339 нм равна 6.22 * 10±3.

Стандартизация может выполняться по растворам с известными характеристиками или по эталонным светофильтрам. Для приборов с узкой шириной полосы пропускания используется хлорное оксидное олово , имеющее очень узкие полосы пропускания 279.3; 278.6; 333.8; 360.8; 418.5; 536.4; 637.5 нм, для широкополосных приборов дидимиевый фильтр, имеющий максимум пропускания при 530 нм (зеленая область).

Для проверки точности измерения оптической плотности используются также растворы бихромата калия ($K_2 Cr_2 O_7$). Реактив высушивается при 110 °С в течении часа, навеску 0.0500 г растворяют в 1 л 0.005 моль/л серной кислоты. Абсорбция на длине волны 350 нм в кювете 10 мм при 15-25°С против 0.005 моль/л серной кислоты должна быть 0.536±0.005. Природная ширина полосы растворов бихромата при 350 нм 63 нм; для спектрофотометров с шириной щели меньше 6 нм этот раствор должен выявлять пик абсорбции при 350 нм.

Стеклянные фильтры умеренного нейтрального стекла (StuffN9-4 SRM 930) в сертификатах дают калибровки на 4 длинах волн от 440 до 635 нм.

Современная фотометрическая лабораторная техника представлена приборами различной степени сложности, что позволяет выбрать тот вариант фотометра, который наиболее соответствует конкретным условиям и задачам данной лаборатории. Наиболее распространены фотоэлектроколориметры (фотометры) - приборы для измерения светопропускания или светопоглощения, котрые обеспечивают потребности основной массы клинико-диагностических лабораторий при выполнении большей части биохимических, коагулологических, иммунохимических исследований при работе как в ручном, так и в полуавтоматическом режиме. Фотометры для ручных методов и программируемые полуавтоматические фотометры небольшой производительности применяются главным образом как базовые приборы в клинико-диагностических лабораториях небольшой мощности и экспресс-лабораториях. Полуавтоматические фотометры с встроенными термостатами для инкубации реакционной смеси и термостатируемыми проточными кюветами для микроанализа могут использоваться не только как базовые приборы в небольших или средних по мощности лабораториях, но и как вспомогательные приборы к автоматическим анализаторам. Фотометры, оснащенные встроенными микропроцессорами, управляющими процессами фотометрического измерения, термостатирования, расчета и автоматической выдачи результатов, контролирующими этапы работы прибора, могут быть одноканальными (для последовательного измерения реакционных смесей в одной кювете) или многоканальными (для одновременного измерения их в нескольких кюветах). Такие приборы называют полуавтоматическими фотометрическими анализаторами. Их производительность подчас сравнима с автоанализаторами, хотя работа на них всегда требует участия оператора в процессе анализа. Некоторые из них (например, Vitalab Eclipse) при дооснащении дилютором и самплером могут быть преобразованы в так называемые серийные (batch) автоанализаторы (Vitalab Eclipse Plus). В таблице 8 приведены технические характеристики ряда фотометров отечественного и зарубежного производства

Широкое применение находят также *многоканальные фотометры*, в которых применена оптическая схема, позволяющая установить одновременно много (до 96) проб, и фотометрировать их либо одновременно, либо последовательно за короткий промежуток времени. Естественно, что такие приборы работают по однолучевой схеме. Многоканальный фотометр

- это шаг к биохимическому анализатору, от которого он отличается тем, что автоматизирует только фотометрию, один из многих этапов анализа.

В многоканальных фотометрах обычно используется вертикальная схема, когда луч света идет снизу вверх или сверху вниз, а у измерительной кюветы только одна грань - нижняя, функцию верхней грани выполняет мениск жидкости. Способ вертикальной фотометрии был предложен и теоретически обоснован Suovaniemi (1976, 1982). Было показано, что поскольку общая масса абсорбирующего свет вещества в растворе всегда размещена между уровнями нулевым и верхним, то независимо от вертикального распределения молекул вещества и независимо от количества сольвента в кювете, величина абсорбции света A равна специфической абсорбции исследуемого вещества a , умноженной на его массу m и деленную на площадь поперечного сечения кюветы S :

$$A = \frac{a}{S} m$$

Поэтому случайное или же предусмотренное методикой разбавление пробы не сказывается на результатах , так как уменьшение концентрации компенсируется увеличением столба жидкости (рис.27). По вертикальной схеме выполнены многоканальные фотометры для иммуноферментных исследований - считыватели (ридеры). Эти относительно простые и дешевые приборы конструируются так, чтобы все определение, включая цветную реакцию и фотометрию, можно было выполнить в одном объеме, функцию которого выполняет лунка в прозрачной пластмассовой пластине. На рис. 28 представлен автоматический вертикальный фотометр «Униплан» (ЗАО «Пикон», Россия) для измерения оптической плотности (концентрации) в планшете на 96 микрокювет с точностью +-1% в спектральном диапазоне 405 - 650 нм.

В таблице 9 представлены технические характеристики некоторых полуавтоматических анализаторов отечественного и зарубежного производства..с вертикальным измерением абсорбции света для фотометрического иммуноферментного анализа

Отражательные фотометры или рефлектометры - особый вид фотометрических устройств для количественного измерения света, отраженного поверхностью (рис.29). В клинической лабораторной диагностике они находят применение в «сухой химии» , когда цветная биохимическая реакция проводится на полоске (стрипе), в результате чего определенная зона полоски окрашивается. Технически эти методы просты и занимают мало

Сравнительная характеристика фотометров и фотометрических

Наименование прибора, фирма, страна	Колориметр фотоэлектрич. КФК-2, ЗОМЗ, Россия	МКМФ-02М, Россия	Microlab, Merck, Германия	Dr. Lange LP-400, LP-700 Dr. Lange, Германия	Assey STAT-Lab, Швейцария
Источник света, спектральное деление, длина волны, нм	Галогеновая лампа, светофильтры 315-980	Светофильтры 400-650 (425, 458, 515, 540, 570, 610)	кварцево-водная лампа, 6 светофильтров, 2 по желанию заказчика, 330-900	6 светофильтров 8 светофильтров	5 светофильтров (340,405, 500, 546, 620)
Диапазон оптической плотности	0-1,3	0,3-2,3			
Тип кюветы, Длина пути света, мм	наливная, сменная 10-50	наливная, (проточная как опция), 10	проточная 10	наливная, сменная 10 проточная	сменная 10
Термостатирование измерительного блока	нет	37 °С	25, 30, 37°С	?	37 °С
Объём реакц. смеси для измерения, мкл (объем кюветы)	500-40000	500-1000	250 (32)	500	800-1000
Способ измерения:					
—КТ	М+	М+	М+	М+	М+
—кинетический	-	М+	Б+	М+	М+
—кинетика-2Т	-	-	М+	М+	М+
—фиксиров. абсорбция	-	-	М+	М+	
Способ расчета рез-тов:					
—ручной	+	+	+		
—автоматический:	-	+	+	+	+
—калибровочный р-р		+	+	+	+
—фактор		+	+	+	+
—калибров. кривая:		+	+	+	
—линейная		+	+	+	
—нелинейная			+	+	
Способ выдачи рез-тов, тип принтера	стрелочный прибор, дисплей	дисплей, внешний принтер	дисплей, внешний принтер	дисплей, термопринтер, внешний принтер,	дисплей, внешний принтер
Аналиты	субстраты, гемоглобин, ферменты (КТ)	гемоглобин и др. субстраты, ферменты	субстраты, ферменты, электролиты белки, гормоны	субстраты, ферменты, электролиты компоненты гемостаза	ферменты, субстраты, электролиты
Использование реактивов различных изготовителей	+	+	+	+	+

Таблица 8

анализаторов для ручного и полуавтоматического анализа

Cormay Plus Cormay, Польша	Cormay Multi Cormay Diagnostica, Польша	Clin-Chek Plus, Hospitex	Screen Master Plus, Hospitex Diagnostica, Швейцария	Stat Fax 1904 Awareness Technology Inc. США	Humalyzer Junior Human, GmBH Германия
галогеновая лампа, 7 интерференционных светофильтров (340-800), 1 свободн. поз.	галоген. лампа интерференц. светофильтры (340, 405, 500, 546, 578, 630 +2 свободн. поз.)	5 светофильтров (340, 405, 505, 546, 630)	6 интерференционных светофильтров 320-700	6 светофильтров (340, 405, 450, 492,550, 600)	5 светофильтров (340,405, 505,545, 578)
0-2,5	-0,2-2,2	0,005-2,0	0,005-2,5	0-2,5	0,0-2,0
проточная, 10	проточная, сменная квадратная и круглая ,10	наливная сменная 10	наливная сменная 10	наливная; проточная (опция)	наливная сменная, 10
25, 30, 37°С	23-40°С	сухой инкубатор на 2 кюветы, 37±0,2°С	-"-	37°С, 12 поз. для термостатир.	37°С, 2 поз. для термостатир
500 (32)	100-5000, проточная кювета-18мкл	500	500	500-1000	500-1000
М+ М+ М+ -	М,Б+ М+ М+ М+	М+ М+ М+ -	М+ М+ М+ -	Б+ Б+ Б+ -	М+ М+ М+ М+
+ + + + +	+ + + + + +	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +	+ + + +
встроенный термопринтер,	дисплей, встроенный термопринтер	дисплей, встроенный принтер, термобумага	дисплей, встроенный принтер, термобумага	дисплей, встроенный принтер, термобумага	дисплей, внешний принтер
ферменты, субстраты, электролиты	ферменты, субстраты, белки, гормоны электролиты	ферменты, субстраты	ферменты, субстраты	ферменты, субстраты, белки	Ферменты,субстраты
+	+	+	+	+	+

Сравнительная характеристика фотометров и фотометрических

Наименование прибора фирма, страна	Humalyzer 2000 Human, GmbH, Германия	RA 50, Technicon Bayer, США	ERBA – CHEM-5 PLUS Transasia Nittec Co. Япония	Vitalab Eclipse Merck, Германия	FP-900 (M) Labsystems, Финляндия
Источник света, спектральное деление, длина волны, нм	6 светофильтров (340, 405, 505, 545, 578,630)	галогеновая лампа 7 светофильтров (340, 405, 500, 546, 578,620, 670)	галогеновая лампа, 8 интерференц. светофильтров, (340, 380, 405, 492, 510, 546, 578, 630)	галогеновая лампа, 330-900 нм	кварцево-галоген. лампа, 8 интерференц. светофильтров (340, 405, 450, 500, 546, 560, 580, 620)
Диапазон оптической плотности, ед. опт. плотности	0-2,2			0-2,3	0-2,3
Тип кюветы, Длина пути света, мм	наливная смешная, проточная (лампа)	проточная или смешная	проточная (лампа), смешная (лампа) 10мм	встроенные проточная и смешная	9-канальные блоки кювет и наконечник
Термостатирование измерительного блока	37 °С, 12 ванной для термостатирования	25, 30, 37°С	25, 30, 37°С	25, 30, 37°С	30, 37°С
Объём реакционной смеси для измерения, мкл, (объем кюветы)	500	500	500 (33–объем проточной кюветы)	250 (32-объем проточной кюветы), 400-1000 (прямоугольные или круглые кюветы)	200-760
Способ измерения:					
—КТ	М+	М,Б+	М,Б+	М,Б+	М+
—кинетический	М+	М,Б+	М,Б+	М+	М+
—кинетика-2Т	М+	М,Б+	М,Б+	М+	М+
—фиксиров. абсорбция	М+		+	М+	-
Способ расчета рез-тов:					
—ручной		-	-	+	+
—автоматический:	+	+	+	+	+
—калибровочный р-р	+	+	+	+	+
—фактор	+	+	+	+	+
—калибров. кривая:	+	+	+	+	+
—линейная	+	+	+	+	+
—нелинейная	+	+	+	+	+
Способ выдачи рез-тов, тип принтера	дисплей, встроенный термопринтер,	дисплей, термо-принтер	дисплей, встроенный графич. термопринтер	дисплей, встроенный принтер, обычная бумага	встроенный термопринтер,
Аналиты	ферменты, субстраты, белки	ферменты, субстраты, электролиты, белки, лекарства, гормоны, иммунолог. тесты, уринализ	ферменты, субстраты, белки, коагулологические тесты	ферменты, субстраты, белки, гормоны, коагулологич. тесты	ферменты, субстраты, белки, электролиты, гормоны
Встроенные программы контроля качества	+	+	+	+	+
Использование реактивов различных изготовителей	+	+	+	+	+

Используемые сокращения: КТ – измерение в конечной точке реакции; М – монохроматический способ измерения; Б - бихроматический способ измерения

Примечания:

Humalyzer 2000. Хранение в памяти 60 методик; возможность выполнения коагулологических тестов при подключении блока COAGS - 500 измерений в час по КТ 20-40 кинетических измерений.

RA 50. Хранение в памяти более 106 методик и до 50 результатов исследования контрольных материалов. Возможность работы от сети и аккумулятора.

ERBA – CHEM-5 PLUS. Хранение в памяти 128 методик, возможность построения многоточечных калибровочных кривых.

Vitalab Eclipse. 4 канала для свободно-программируемых методик, преобразуется при наличии самплера и диляторa в полный серийный автоанализатор со сменной программой.

Продолжение таблицы 8

анализаторов для ручного и полуавтоматического анализа

Fotometer BM 5010, Roche, Швейцария	Минилаб 501 прогр. фотометр биохим. Техномедика-Юниэл Россия	Минилаб 502 прогр. фотометр биохим. Техномедика-Юниэл, Россия	Минилаб 503 полуавтоматический Техномедика – Юниэл, Россия	ФЛЮОРАТ 02-АБФФ, "Люмекс", Россия	Фотометры 2110, 2111 АО НТП СОЛАР, Беларусь
галогеновая лампа, 5 светофильтров + 3 доп. по заказу заказчика (340-700)	галогеновая лампа 6 светофильтров (340, 404, 492, 600, 690)	как Минилаб 501	как Минилаб 501	6 светофильтров (340, 405, 505, 575, 630+ 2 дополнит.)	вольфрамовая галогеновая лампа, 8 светофильтров (340, 405, 500, 520, 540, 620, 670)
0,2-2,5	-0,12-2,5	как Минилаб 501	как Минилаб 501	0-2,2	0-2,0
проточная (опция)(10,5), внешняя (опция) (10)	круглые, прямоугольные,10мм	как Минилаб 501	как Минилаб 501	наливная, сменная (опция), проточная)	наливные полистирольные одноразовые,10
25, 30, 37°С	37 °С, 2 позиций в инкубаторе)	как Минилаб 501	как Минилаб 501	25, 30, 37°С	37 °С±0,5°С
Проточная 500 (32мкл, путь света - 10мм; 60 мкл, путь света - 5мм), сменная – 1000 или 500	1000	как Минилаб 501	200	3000 для сменной кюветы 600-1000 для проточной кюветы (80)	300-1000
М,Б+ М,Б+ М,Б+ М+	М,Б+ - - -	М,Б+ М,Б+ М,Б+ -	М,Б+ - - -	М,Б+ М,Б+ М,Б+ -	М+ М+ М+ -
+ + + + + +	+ + + + + +	+ + + + + +	- + + +	+ + + + + +	+ + + + +
встроенный, принтер, обычная бумага	дисплей, инфракр. интерфейс, обычная бумага	как Минилаб 501	как Минилаб 501	дисплей, внешний принтер	дисплей, струйный внешний принтер
ферменты, субстраты, белки, гормоны, электролиты, компоненты гемостаза	ферменты (КТ), субстраты, гормоны, электролиты	ферменты (кинетич.), субстраты, гормоны, электролиты	белки	ферменты, субстраты, гормоны, электролиты, белки	ферменты, субстраты, гормоны, белки
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+

FP-900. 36 свободно программируемых каналов, возможность повышения производительности до 110-144 анализ при соединении с PC on line.

Fotometer BM 5010. Хранение в памяти более 100 методик, 600 измерений в час для КТ, 60 кинетических измерений в час.

Минилаб 501. Хранение в памяти программ для 50 методик, 150 результатов. Использование 1 принтера для нескольких приборов. Производительность 20 проб/мин.

Минилаб 502. Производительность 5 проб/мин.

Минилаб 503. Автоматическая внутренняя калибровка по 7 калибровочным растворам.

ФЛЮОРАТ 02-АБФФ. *Автоматическая смена светофильтров, производительность до 100 анализ/час, 40 программируемых каналов для методик. Прибор представляет собой фотометр, флуориметр и хемилюминометр.*

Фотометры 2110, 2111. *Детектор – кремниевый фотодиод.*

Рис. 27. Схематическое представление зависимости результатов измерения в вертикальном фотометре от общего количества вещества, абсорбирующего свет (А), и отсутствия зависимости от длины пробега луча в исследуемом растворе и концентрации вещества в растворе (Б) (по O. Suovaniemi, 1984).

***Рис. 28**. Вертикальный автоматический фотометр «Униплан» (ЗАО «Пикон», Россия).*

времени, клинический персонал может проводить их непосредственно у постели больного. В качестве источников света в таких системах используются светодиоды, эмитирующие свет той длины волны, которая специально подобрана для определенной цветной реакции на исследуемой зоне диагностической полоски. Для детекции отраженного от окрашенных зон полоски света могут применяться измерительные головки, воспринимающие свет через отрезок времени, соответствующий скорости развития окрашивания зоны, предназначенной для детекции определенного аналита. В отражательных фотометрах «Miditron M», «Miditron Junior II», «Urilux S» и «Supertron»(Roche Diagnostics), предназначенных для исследований мочи с помощью диагностических полосок «Combur [10] Test M», каждая измерительная головка включает три светодиода, эмитирующих свет различных длин волн (таблица *10*, рис. 29).

Рис. 29. Схема принципа оптико-электронного измерения в отражательном фотометре Supertron («Roche Diagnostics»).

Таблица 9

Сравнительная характеристика некоторых полуавтоматических анализаторов для фотометрического иммуноферментного анализа

Характеристики анализатора	Наименование анализатора, фирма, страна								
	АИФ-01-С НПП "ИЛИП" Россия	АИФ-М НПП «ИЛИП», Россия	АИФ-П НПП «ИЛИП» Россия	Униплан ЗАО ПИКОН, Россия	Multiscan EX, RC, Ascent, Labsystems, Финляндия	EL-800 BIO-TEK Instruments, Inc., Финляндия	EL-808U BIO-TEK Instruments Inc., Финляндия	iEMS Reader MF Labsystems, Финляндия	Benchmark BIO-RAD LABORATORIES, США
Спектральный диапазон, нм	405-650	340-620	405-750	405-650	340- 750 (опция) 400-750	400-700 340-700	340-900	340-850	340-700
Диапазон измерения ед. опт. пл.	0-2,0	0-2,5	0-2,5	0-2. 5		0-3,0	0-4,0	0-4,0 (0-6,0-динамический режим)	0-4,0?
Тип планшета	96-луночные с плоским дном	96-луночные с плоским дном	96-луночные с плоским дном	96-луночные с плоским дном	96	стрипы, планшеты с плоским, круглым, коническим дном, планшеты 24-, 48-, 96-, 384-луночные	96-луночные планшеты и стрипы с плоским, круглым, коническим дном	стрипы и 96-луночные планшеты с плоским дном	Стрипы 96-луночные планшеты с плоским дном

Время анализа одного планшета, с	150	60	5	90	5	50 (30-быстрый режим)	12, мин. Кинетический интервал 5с	6(обычный режим) 3 (быстрый режим)	7с на 1 длине волны, 15с на 2-х длинах волн
Способы измерения									
-конечн. точка	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-кинетический	-	+	+	+	+	+	+	+	+
-монохроматический	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-бихроматический	+	+	+	-	+	+	+	+	+
-2 точки	-	-	-	-	+	?	?	+	?
агглютинация	-	-			+			+	
Способ установки длины волны	Автоматический	Автоматический	Ручной	Ручной	Автоматический	Автоматический	Автоматический	Автоматический	Автоматический
Холостая проба									
-по воздуху;	+	+	+	+	+	+	+		+
-по заполненным лункам;	+	+	+	+	+	+			+
-попарное вычитание ОП* лунок соседних стрипов;	–	–	–	–	+	+	+		
-попарное вычитание ОП* лунок соседних рядов;	–	–	–	+	+	–	–		+,?
-отдельные хо-	–	–	–		+	+	+		

лостые пробы для каждого стрипа;									
-автоматический расчет средней арифметической из ОП* холостых проб и вычитание их в автоматическом режиме;	–	–	–	–	+	+	+		+
				–		+			+
Встроенное программное обеспечение. Обработка данных кач-ных тестов:									
-до 8 разных контрольных материалов в одном тесте	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-расчет «cut-off»	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-расчет серой зоны	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-ранжирование результатов	+	+	+	+	+	+	+	+	
Обработка данных количественных тестов:									

-8 и более калибраторов для калибровочной кривой	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-алгоритмы построения калибровочных кривых, методы:									
-от точки к точке	?	?	?	+	+	+	+	+	+
-линейная регрессия	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-квадратичный	?	?	?	+		+	+		+
-2 параметрический (logit-log)					+	+	+	+	+
-4.параметрический						+	+	-	
-кубический сплайн				+	+	+	+	+	
-автоматический расчет концентрации	+	+	+	+	+	+	+	+	
Встроенный встряхиватель	–	–	–	–	+	+	+	+	+
Встроенный термостат	–	–	–	–	+	+		+	+
Отличительные особенности			Переносной прибор						16-канальная система из оптического волокна

Таблица 10

Условия фотометрического измерения различных зон диагностических полосок в отражательном фотометре «Miditron M» (Roche Diagnostics).

Аналит	*Измерительная головка 1 (48 сек)*	*Измерительная головка 2 (120 сек)*
Относит. плотность	620 нм	-
pH	620/555 нм	-
Лейкоциты	-	555 нм
Нитриты	555 нм	-
Белок	555 нм	-
Глюкоза	555 нм	-
Кетоны	-	555 нм
Уробилиноген	555 нм	-
Билирубин	555 нм	-
Эритроциты	-	660/555 нм

Особенность отражательной фотометрии в том, что нужно измерить сумму световых потоков, которые отразились от исследуемой поверхности в разных направлениях. Предварительно свет надо собрать в одно место. Это достигается таким образом, что исследуемый объект помещается в сферу (шар), внутренние стенки которого равномерно отражают все цвета спектра. Лучи света, отраженные и рассеянные в разных направлениях, многократно отражаются от внутренней поверхности шара, внутри которого создается равномерная освещенность, интенсивность которой определяется суммой всего отраженного исследуемой поверхностью света. Иными словами, сфера усредняет свет по всем направлениям. Фотоприемник вмонтирован в сферу, фиксируя освещенность внутри нее (Рис.30).

Интенсивность отраженного света связана с содержанием исследуемого вещества формулой Кубелка-Мунка:

$$\frac{C/e}{S} = \frac{(1 - R)^2}{2R}$$

где: C - концентрация исследуемого вещества,

S - отражающая поверхность,

R - количество отраженного света,

e - молекулярный коэффициент экстинкции.

После преобразований эта формула принимает вид:

$C = -(S/e) + (S/2e)R^{-1} + (S/2e)R$

Рис. 30. Схематическое представление процесса измерения и обработки результата в отражательном фотометре.

В «Рефлотроне» используется функция:

$C = A0 + A1R^{-1} + A2R^{n*R} + A3$

В случае, если n>0, калибровочный график имеет сигмообразную форму, если же n<0, то гиперболическую.

Принцип отражательной фотометрии нашел применение при использовании различных вариантов «сухой химии» (диагностические полоски, многослойные аналитические элементы - см. раздел «Лабораторные реагенты») для исследования различных аналитов в крови, сыворотке, плазме. В таблице 11 представлены технические характеристики некоторых полуавтоматических отражательных фотометров для работы средствами «сухой химии» с кровью.

Спектрофотометры - оптические приборы, позволяющие пропускать через исследуемый образец световой поток любой требуемой длины и проводить фотометрические измерения (светопропускания и светопоглощения), просматривая , т.е. сканируя весь диапазон длин волн в области ближнего ультрафилетового и видимого света с возможностью построения спектральных кривых светопоглощения. Это дополнительная важная функция спектрофотометров по сравнению с обычными фотометрами. Хотя в клинико-диагностических лабораториях достаточно широко используют простые спектрофотометры, в том числе для ручной работы , все же основная тенденция развития технической мысли идет в направлении создания специализированных лабораторных приборов для КДЛ и универсальных спектрофотометров для научных исследований, возможности которых по ряду пунктов выходят за пределы потребностей клинической лаборатории.

Таблица 11

Полуавтоматические отражательные фотометры («сухая химия» для работы с кровью сывороткой, плазмой) для диагностики у постели пациента.

Прибор, фирма, страна	Оптические характеристики	Термостатирование измерительного блока	Способ измерения - КТ	Авто мат. способ расчета	Способ выдачи рез-тов	Аналиты	Использование реактивов др. фирм	Контроль качества	Примечание
Reflotron II ,IV Roche Швейцария	диоды,возбуждающие свет(LED 567,642,951)	25° С 30° С 37° С	+	+	дисплей встроенный принтер, обычная бумага	ферменты, субстраты, калий	закрытая система	автоматический контроль по контрольной полоске	Тест-полоски с магнитным кодом, 32 мкл цельной крови или сыворотки или плазмы (калий, холестерин липопротеидов высокой плотности).
Seralyzer III Miles, США	ксеноновая импульсная трубка, 9 светофильтров (340,530,535, 560,580,600, 620,640,740)	-	+	+	дисплей, внешний принтер, обычная бумага	15 тестов, ферменты, субстраты, калий, лекарства	закрытая система		Тест-полоски, 10 мкл сыворотки или плазмы на 1 определение, автокалибровка, хранение в памяти 25 результатов.
ДТ60 II Kodak Ektachem, Jonson &Jonson, США	возбуждающие свет диоды: зеленый, красный, желтый	встроенный термостат	+		дисплей, термопринтер	в зависимости от модуля: электролиты, ферменты, кальций, теофиллин, субстраты, лактат, анионный интервал	закрытая система		"Сухая химия", используется 10 мкл сыворотки или плазмы, анализатор предназначен для экспресс-лабораторий

Современный спектрофотометр- это большой полностью компьютеризованный полуавтоматический или полностью автоматизированный агрегат, который может проводить измерения с точным выделением требуемой длины волны монохроматического света в очень широком диапазоне длин волн - ультрафиолетовом, видимом и инфракрасном, построенный по двулучевой схеме. Результаты измерений обрабатываются компьютером, запоминаются в электронной форме и выдаются на дисплее. Чтобы иметь возможность получать сопоставимые спектры для различных диапазонов длин волн, прибор снабжается так называемой «щелевой программой», которая обеспечивает получение равномерных по ширине пучков монохроматического света по всему рабочему диапазону. В таблице 12 представлены технические характеристики некоторых спектрофотометров отечественного и зарубежного производства.

Хемометрия. Это новая область фотометрического анализа, которая занимается исследованием сложных многокомпонентных смесей, где на спектр аналита накладываются спектры других, мешающих определению (интерферирующих) веществ. В этом случае приходится измерять оптические плотности на многих длинах волн и подбирать такую их комбинацию, которая пропорциональна концентрации аналита.

В последнее время были разработаны так называемые хемометрические инструменты - комплекс физических устройств и математических программ, которые позволяют, обрабатывая сразу значительный спектральный интервал, выделять полезную аналитическую информацию на фоне значительных помех. Хемометрические методы больше всего подходят для исследований в инфракрасной области, в которой органические соединения имеют многочисленные интенсивные полосы поглощения, поэтому анализ можно выполнять, не проводя цветных реакций, но взаимная интерференция разных соединений очень велика.

Производные спектры. Дополнительная возможность современного спектрофотометра - это получение производных спектров высокого порядка. Спектр поглощения исследуемой пробы имеет вид кривой, на которой есть участки высокого поглощения - пики и более низкого - впадины. В ряде случаев этого достаточно для количественного исследования. Однако, анализируя ход кривой, можно получить дополнительную информацию, которая содержится в производной, т.е. в скорости изменения оптической плотности при изменении длины волны света. Регистрируя ее, удается обнаружить участки, где оптическая плотность быстро нарастает (это начало пика) или падает (это его конец). В анали-

Таблица 12

Сравнительная характеристика некоторых спектрофотометров

Технические характеристики	Наименование спектрофотометра, фирма, страна										
	КФК-3, ЗОМЗ, Россия	СФ-121, ЛОМО, Россия	Спектрофотометры серии, Beckman, США		Specol UV/VIS Zeiss, Германия	Hitachi U-1100, Hitachi, Япония	Hitachi U-3000, U-3300 Hitachi, Япония	Spectronic 20 Spectronic Instruments Inc. США	Genesis 2, Genesis 5 Spectronic Instruments Inc. США	CL-770, Shimadzu, Япония	PV1251-A, C АО НТЦ СОЛАР, Беларусь
			DU 500, 600	DU 7500							
Источник света, спектральное деление	галоген. лампа; вогнутая дифракц. решетка	галоген. лампа, дейтер. лампа	вольфрам. и дейтер. лампы, голографич. решетка		галоген. и дейтер. лампы, голограф. решетка	вольфрам. -иодная и дейтер. лампы, вогнутая дифракц. решетка	дейтер., вольфрам -иодидная лампа, вогнутая дифракц. решетка	вольфрам. -галоген. лампа, монохроматор, светофильтры	вольфрам-галоген и дейтер. лампы, расщепл. луча, монохромат. с голограф. решеткой	галоген. лампа, монохроматор, голограф. решетка с коррекцией на аберацию	вольфрам галоген. лампа, монохроматор двойной с дифракц. решетками
Устройство: -1-лучевой, -2-лучевой	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Диапазон длин волн, нм.	315-900	200-760	190-1100	190-800	190-1100	200-1100	190-900	325-1100	200-1100	325-1100	325-999
Диапазон изм. опт. плотн., ед. опт. плотн.	0,0-3,0	0,0-2,0	-0,3-3,0		-1,0-3,0			0,1-2,5	-0,3-4, 0,3-4,0	0-3,999	
Полоса пропускания, нм.	7		≤4,5 для сер. 500, 1,8 для сер. 600	2	2 или 5 нм по выбору	5	0,15	<8	2 5	5	5

Термостатирование при измерении.	- +, 37°C, в комплексе "Фотофермент"	+,37 °C	+, 37°C		25, 30, 37°C			-	+ как опция	как опция 25, 30, 37°C	37°C
Тип кюветы, длина оптического пути, мм.	сменная, 5-100	сменная, 10	сменные, проточн., капиллярные для ультрамикроанализа *	сменная, 1-150 проточные	сменные, 1 кювета на 10 мм или 4-кюветный кюветодержатель, кюветы на 1-50мм проточн. кювета	автоматизированная проточная кювета, до 50	РМТ	прямоугольная, сменная, 10	10-100 проточн., круглые, квадратн. сменные	проточн.– 5мм, квадратн. –10мм	квадратн. сменная, полистирольная
Объем жидкости достаточный для измерения, мкл, (объем кюветы, мкл)	3000 для кюветы 10мм	0,3-1,0	50 для рутинных анализов		0,3-1,0			объем кюветы-500-1000	ультрамикрокюветы – мин.-70; макс.-3000; прочие кюветы – мин.– 1300мкл; макс.-56мл	проточн. (16), квадратн. (500)	300-1000
Детектор	фотодиод	фотодиод		512-элементный фотодиод	силикон. фотодиод	силикон. фотодиод		силикон. детектор	2 детектора: для пробы и референсный	2 силиконовых фотодиода	кремн. фотодиод

Технические характеристики	Наименование спектрофотометра, фирма, страна										
	КФК-3, ЗОМЗ, Россия	СФ-121, ЛОМО, Россия	Спектрофотометры серии, Beckman, США		Specol UV/VIS Zeiss, Германия	Hitachi U-1100, Hitachi, Япония	Hitachi U-3000, U-3300 Hitachi, Япония	Spectronic 20 Spectronic Instruments Inc. США	Genesis 2, Genesis 5 Spectronic Instruments Inc. США	CL-770, Shimadzu, Япония	PV1251-A, С АО НТЦ СОЛАР, Беларусь
			DU 500, 600	DU 7500							
Способ измер. -КТ; -кинетический; -2-точки, кинетический; -многоволнов.	 + - +* -	 + + + -	 + + + +		 + + + +			 + - - -	 + + + +	 + + + 2-волнов.	 + + + +
Сканирование спектров, скорость, нм/мин.	-	весь спектр за 4с	серия 500: от 40 до1000 нм/мин; серия 600: от 120 до 2400 нм/мин	весь спектр за 0,1с	+	2, 10, 100, 200, 400, 800, 1200, 2400			Spectronic Genesis 2: медлен.– до 200; средняя– до 600; быстрая– до1800; турбо-до 2400 Spectronic 5-300 или 900	24-350	9000
Аналиты: -субстраты, -ферменты, -электролиты, -микроэл-ты -белки,	 + +* 	 + + + + 	 + + + + +		 + + + + +*			субстраты, ферменты (КТ), электролиты	субстраты, ферменты, электролиты, микроэлементы	субстраты, ферменты, электролиты, микроэлементы	субстраты, ферменты, белки
-нуклеиновые кислоты: -сканирование гелей -фракции при разд. и очистке в-в			+ + +								
Способы расчета результатов: -ручной, -микропроцессор, -по калибр. раствору; -по калибр. кривой; -по фактору	 + + + + +	автоматический + + + +(2-9 кал. р-ра) +	Автоматический + + + +		автоматический + + + 			калибр. раствор, фактор	отношение оптич. плотн. и величины светопропускания, калибр. раствор, фактор, калибр. кривая, площадь под кривой	по калибр. раствору, калибр. кривой, линейной или нелинейной (2-10 калибр. раствора) квадратичный, кубический многолин. анализ	фактор, калибр. раствор, многоточечная калибр. кривая линейная, нелинейная
-Дисплей, -Принтер	+ 	+ +, внешний	серия 500-ч/б серия 600-VGA (монохромный или цв.) +	+ +, внешний	+ + термопринтер			дисплей, встроенный термопринтер	Spectronic Genesis 2: цв дисплей с изображением до 8 сканограмм спектров одноврем. Spectronic Genesis 5: монохро-	дисплей, высокоскоростной термопринтер	дисплей/монитор персонального компьютера, внешний принтер

									матич. дисплей; в обоих – встроен. принтер.		
Масса, кг.	не более 15	10	серия 500-9, серия 600-37	10	18	-		4,5	12,3	26	8,0

Примечания:

КФК-3, ЗОМЗ, Россия. *Только в составе комплекса "Фотофермент".

СФ-121, ЛОМО, Россия. Встроенный микропроцессор, автоматизированное термостатируемое кюветное отделение на 10 кювет, возможность использования кювет из акрила и полистирола. Встроенные программы контроля качества. Адаптер для работы от аккумулятора. Общее время анализа – от 2 до 5 мин.

Спектрофотометры серии DU 500, 600, 7500, Beckman, США. * Объем 5 мкл для особо ценных препаратов.

Specol UV/VIS Zeiss, Германия. *До 30 программ для различных методов.

Hitachi U-1100, Hitachi, Япония. Транспорт 4 кювет, автоматический запуск всасывания реакционной смеси в кювету.

Hitachi U-3000, U-3300 Hitachi, Япония. Как опции: роботизированный автодозатор проб, транспорт 12 кювет, поправки на мутность и отражение света ,кюветодержатель для кювет с большой линой оптического пути.

Spectronic 20 Spectronic Instruments Inc. США. Портативный спектрофотометр, имеются сменные кюветы в виде пробирок для измерений при иммунохимическом анализе.

Genesis 2, Genesis 5 Spectronic Instruments Inc. США. Автоматический анализ нескольких проб (при использовании 8-позиционного кюветодержателя); автоматический контроль работы приборов. Возможность использовани карт хранения информации программ и данных – SoftCard.

CL-770, Shimadzu, Япония. Хранение в памяти 36 методик на 4–х каналах, карты памяти, хранение в памяти спектров.

PV1251-A, С АО НТЦ СОЛАР, Беларусь. Автоматическая установка шкалы, арифметические вычисления между спектрами, определение максимумов и минимумов в спектре, расширение и сжатие спектров, вычисление площади под кривой, интерполяция, сглаживание, расчет статистических характеристик, документирование спектров, кинетических и калибровочных кривых и таблиц.

тической практике, особенно при спектральном анализе сложных смесей, чаще всего используют вторую производную, хотя современные исследовательские спектрофотометры позволяют измерять производные (дериваты) спектров и более высоких порядков.

Флюорометрические методы

Среди оптических методов измерения концентраций аналитов в клинической лабораторной практике большое место занимает измерение света, излучаемого молекулами исследуемых веществ. Испускаемый молекулами свет несет энергию, высвобождаемую при переходе электронов из возбужденного (метастабильного) состояния в невозбужденное. Электрон оказывается на более высоком энергетическом уровне в результате поглощения кванта энергии при облучении интенсивным световым потоком из внешнего источника, либо в результате химической реакции, либо за счет кинетической энергии теплового движения при высокой температуре пламени. Эти три возможных вида возбуждения молекул используются в различных вариантах эмиссионных оптических методов исследования: возбуждение светом при комнатной температуре в флюорометрии, химическая реакция в люминометрии, температура в пламенной фотометрии , эмиссионной спектроскопии. Квантовые основы этих методов аналогичны друг другу.

Среди процессов испускания света при комнатной температуре различают:

- флюоресценцию, когда молекула находится в возбужденном состоянии очень недолго, излучение следует непосредственно за поглощением возбуждающего света,

- фосфоресценцию, когда молекула долго находится в метастабильном состоянии, время между поглощением возбуждающего света и эмиссией может длиться часами,

- хемилюминесценцию, когда источником энергии служит химическая реакция. Возвращение в исходное (невозбужденное) состояние может происходить различными способами, лишь один из которых флюоресценция, т.е. испускание молекулы света. (Рис.31) Флюоресцирующая молекула может непосредственно поглощать квант возбуждающего света, но ее «накачка» энергией может быть и опосредованной, когда свет поглощается соседней, иногда многокомпонентной, молекулярной структурой, а только затем передается флюорофору. В этом случае говорят не о флюоресцирующей молекуле, а о мицелле или частице, интенсивность свечения очень зависит от ее состава.

Большинство традиционно используемых в лабораторной аналитике флюоресцирующих веществ- это карбоциклические органические красители. Интенсивность их флюоресценции связана с количеством одинаковых двойных связей, определяющих стабильность и ригидность молекулы, имеет значение также концентрация, температура, pH и ионная сила раствора. Другой класс очень перспективных с точки зрения применения в клинической лабораторной диагностике флюоресцирующих веществ - это редкоземельные элементы, относящиеся к группе лантанидов. Квантовый механизм, лежащий в основе их свечения, несколько отличается от механизма флюоресценции органических молекул. Само испускание света флюоресценции определяется квантовыми переходами в атоме металла, но возбуждающий флюоресценцию свет поглощается более крупной частицей, в состав которой входит также органическая молекула, образующая комплексное соединение с ионом лантанида, и растворитель, поэтому состав среды очень влияет на интенсивность свечения.

Доля излученного света по отношению к поглощенному может колебаться от 0 до 1, отдача молекулой энергии другим способом, помимо свечения, снижает интенсивность флюоресценции. Обычно испускаемый свет имеет большую длину волны (т.е. энергия кванта меньше), чем возбуждаю-

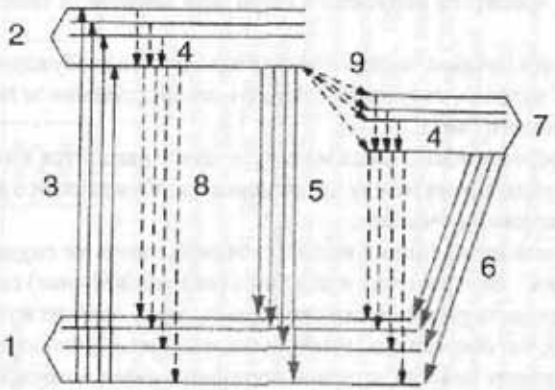


Рис. 31. Модель уровней энергии свечения молекулы органического вещества.(Tiffany, Burtis, 1987) **1**. Основной уровень синглетного состояния. **2**. Первое возбужденное синглетное состояние. **3**. Абсорбция энергии. **4**. Вибрационная дезактивация без излучения света. **5**. Флюоресценция. **6**. Фосфоресценция. **7**. Первое возбужденное триплетное состояние. **8**. Гашение свечения. **9**. Переход для излучения света.

щий, это объясняется потерями за счет безлучистого вибрационного уравновешивания. Меру потери энергии называют «сдвигом Стокса», он определяет разницу между максимальными длинами волн возбуждающего и испускаемого света, которая для органических веществ обычно измеряется десятками нанометров. Время между возбуждением флюоресцирующей органической молекулы и испусканием ей света занимает около одной стомиллионной доли секунды (10 наносекунд). Иное дело флюоресценция лантанидов - здесь оно на пять порядков дольше - около 1 миллисекунды, сдвиг Стокса также сильнее выражен, измеряясь сотнями нанометров.

Наряду с флюоресценцией, одним из способов отдачи энергии является фосфоресценция, которая характеризуется большей, по сравнению с флюоресценцией , величиной сдвига Стокса и временем запаздывания испускания света - от 1 тысячной секунды до нескольких часов.

Вещества, способные флюоресцировать, называются флюорофорами, они используются в клинической химии и лабораторной диагностике для:

1) количественного определения концентрации флюоресцирующего продукта по интенсивности его свечения,

2) чтобы метить различные компоненты биоматериала (как вещества, так и клетки), делая их доступными для исследования.

Отношение концентрации флюорофора к интенсивности эмиссии флюоресценции может быть выведено из несколько модифицированного закона Бера-Ламберта:

$$I = I_o^{-klc} + I_D \text{, где}$$

I - интенсивность прошедшего света,

Io - интенсивность падающего света,

k - коэффициент молекулярной абсорбции,

l - длина пути света,

c - концентрация абсорбирующих свет веществ.

Количество абсорбированного (поглощенного) света (а именно оно определяет интенсивность флюоресценции) получают, вычтя из количества падающего света количество прошедшего:

$$Iklc = I - I_o$$

Интенсивность флюоресценции F пропорциональна количеству поглощенного света и эффективности флюоресценции:

$$F = \varnothing * (I_o - I)^{-klc} = \varnothing * I_o * (1 - I_o)$$

где F - интенсивность флюоресценции,

∅ - эффективность флюоресценции (отношение количества квантов эмитированного по отношению к абсорбированному свету),

I_o - интенсивность возбуждающего света,

k - молярная абсорбция,

l - длина пути света,

c - концентрация моль/л .

Это уравнение указывает, что интенсивность флюоресценции прямо пропорциональна концентрации флюорофора и интенсивности возбуждающего света. Ее величину обычно выражают в относительных единицах. Фактически прибор (флюорометр) улавливает лишь малую часть общей эмиссии флюоресценции, которая зависит от светосилы прибора (ширины щели), чувствительности детектора, эффективности монохроматора. Результаты измерения флюоресценции выражают в единицах концентрации, используя калибровку прибора по исследуемому веществу, либо по специальному эталону, который в химическом отношении может не иметь ничего общего с исследуемой компонентой, но обладать такой же флюоресценцией.

Преимуществами флюоресценции являются простота измерения, высокая специфичность и чувствительность. К недостаткам относятся зависимость результата от многих факторов, что сказывается на линейности калибровочых графиков. Сюда относится насыщение флюоресценции (эффект внутреннего тушения), побочные эффекты, вызванные рассеиванием, неспецифической флюоресценцией растворителя, матриксом пробы (рассеивание света, адсорбция света и расщепление).

Эффект внутреннего тушения состоит в потере интенсивности возбуждения при прохождении света через раствор из-за его абсорбции. С повышением концентрации флюорофора общее количество поглощенного света *возрастает, но линейность между концентрацией и флюоресценцией* сохраняется лишь пока раствор поглощает менее 2% возбуждающего света. Различают два вида рассеяния света - релеевское и рамановское, оба происходят в результате столкновения квантов лучевой энергии с молекулами в растворе, причем рассеянный свет, так же, как и свет флюоресценции, идет под углом к падающему, создавая помехи для измерения.

В случае релеевского рассеяния длина волны света не меняется, в случае же рамановского в спектре появляются дополнительные линии. Для флюорофоров с малым сдвигом Стокса спектры возбуждения и эмиссии взаимно накладываются, поэтому помехи от рассеянного света выше,что снижает чувствительность.

Помехи от релеевского рассеяния могут быть ограничены использованием узких интерференционных светофильтров для возбуждающего и

эмитируемого света или соответствующих монохроматоров, а также применением поляризаторов.

Помехи вследствие рамановского рассеяния уменьшаются с увеличением различия длин волн возбуждающего и эмитированного света и сужением щелей, хотя и то, и другое снижает чувствительность прибора.

Некоторые кварцевые стекла и пластинки содержат материалы, поглощающие ультрафиолетовый свет, или флюоресцирующие. Помехой также является тушение флюоресценции из-за взаимодействия флюорофора с раствором, что приводит к потере энергии, хотя не влияет на молекулярную абсорбцию флюорофора.

Пробы сыворотки и мочи содержат много веществ, способных флюоресцировать, поэтому матрикс (основа) пробы может быть источником неспецифической флюоресценции, например, обусловленной присутствием белка или билирубина. Свет рассеивается также большими молекулами белка и липопротеидными комплексами. Неспецифическое свечение фона - это основная причина, лимитирующая чувствительность флюорометрических методов исследования.

Спектры абсорбции (и, стало быть, возбуждения флюоресценции) большинства флюоресцирующих веществ лежат в области 300-550 нм, это позволяет использовать в качестве источников света яркие лампы с широким спектром: ксеноновую, дуговую, кварцевую или галогеновую.

Поскольку свет флюоресценции рассеивается во все стороны, возможны различные варианты конструкций приборов. Чаще всего фотодатчик расположен под прямым углом к направлению возбуждающего света, что уменьшает засветки, снижающие чувствительность определения (Рис. 32).

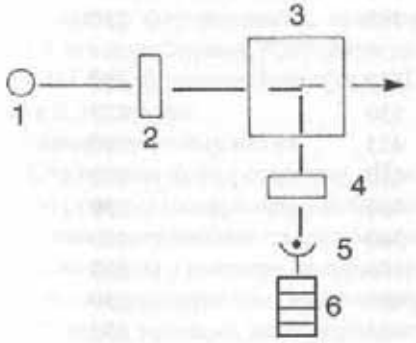


Рис. 32. Схема устройства и светового потока в флюорометре. **1.** Источник света возбуждения. **2.** Монохроматор (светофильтр) света возбуждения. **3.** Кювета с исследуемым раствором. **4.** Монохроматор света флюоресценции. **5.** Детектор. **6.** Измерительный прибор.

Повседневная клиническая лабораторная аналитика использует эффект флюоресценции главным образом для определения флюоресцентных меток - веществ, специально добавляемых в аналитическую систему, которые химически ничего общего с аналитом не имеют. Для каждого из этих соединений характерны собственные длины волн света возбуждения и света излучения (табл.13).

Метки могут быть молекулярные - когда метятся определенные молекулы, и клеточные - когда метятся исследуемые клетки или определенные участки на их поверхности. Менее распространен более традицион-

Таблица 13

Волновые характеристики света возбуждения и излучения флуорохромов

Флуорохром	*Длина волны (нм)*	
	Света возбуждения	*Света излучения*
Акридин оранжевый/ДНК	485	620
Акридин оранжевый/РНК	460	620
Аламар голубой	530	590
Амино-метилкумарин	360	460
Кальцеин	485	530
Метилумбеллиферон	360	460
НАД.Н	300-400	460
Пропидиум иодид	530	620
Резоруфин	460	570
Родамин (лиссамин-родамин)	530	580 или 590
Родамин-изоцианат (XRITC)	530	620
Техас красный	550	620
Флюоресцеин-5-изотиоцианат (FITC)	485	530
Этидиум бромид	530	620
Этидиум гомодимер	530	620
AttoPhos	425	570
CY-5	610	670
DABA	400	530
Yoehst Dye 33258/бис-бензимид	360	460
TOTO	485	530
YO-PRO	485	530
YOYO	485	530

Рис. 33. Флюорометр FluoroCount («Packard», США) для измерения флюоресценции в микропланшетах.

ный подход - когда в результате химических превращений молекула аналита превращается в флюоресцирующее соединение.

Для расширения возможностей применения микропланшетной технологии предложены также флюорометры для измерения флюоресценции в микропланшетах. Флюорометр FluoroCount («Packard», США) (рис. 33) предназначен для измерения флюоресценции в 6-, 12-, 24-, 48-, 96-луночных планшетах с диапазоном длин волн света возбуждения от 340 до 650 нм, и от 340 до 670 нм для света излучения, что перекрывает широкий спектр флуорохромов, включая флуоресцеин-5-изотиоцианин (FITC), этидиум бромид, пропидиум иодид, акридин оранжевый /РНК и ДНК, НАД.Н, метиллюмбеллиферон, DABA, кальцеин, резоруфин, родамин и ряд других.

Флюоресцентные метки

Поляризация флюоресценции. При прохождении через кристаллическую решетку (поляризатор) волны света ориентируются в одной плоскости, такой свет называется поляризованным. В силу броуновского движения молекулы в растворе не только непрерывно перемешиваются, перемещаясь в пространстве, но и хаотически вращаются. Время, за которое молекулы успевают равномерно распределиться в пространстве, на-

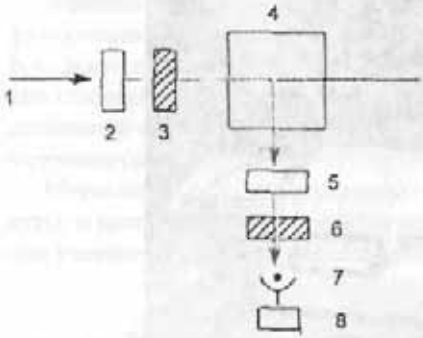


Рис. 34. Схема устройства анализатора поляризации флюоресценции.**1.** Источник света возбуждения. **2.** Монохроматор света возбуждения. **3.** Поляризатор света возбуждения. **4.** Кювета с исследуемым раствором. **5.** Монохроматор света флюоресценции. **6.** Поляризатор света флюоресценции. **7.** Детектор. **8.** Измерительный прибор.

зывается временем релаксации, соответственно говорят и о времени вращательной релаксации, как о том промежутке времени, который необходим для того, чтобы первоначально одинаково ориентированные молекулы оказались равномерно повернутыми в разные стороны. Для больших молекул этот промежуток времени длиннее, чем для маленьких. Если время вращательной релаксации велико по сравнению с временем между поглощением кванта света и его эмиссией (затухания флюоресценции), то молекула флюорофора не успевает повернуться и свет эмиссии будет поляризован в той же плоскости, что и возбуждающий свет. Если же молекула небольшого размера, то она вращается быстро и за время между поглощением света и его эмиссией успевает повернуться. Соответственно свет флюоресценции не будет поляризован в той же плоскости, что свет возбуждения, а будет деполяризованным. Таким способом *можно оценить размеры молекулы. Устройство прибора для анализа поляризации* флюоресценции представлено на рис.34.

Этот эффект используется при проведении гомогенных иммуноисследований. Пока меченый флюорофором антиген не образовал комплекса с антителом, его молекула невелика, вращается быстро и, если ее возбудить поляризованным светом, то флюоресценция будет неполяризованной. Однако, если реакция антиген-антитело уже прошла, образовались высокомолекулярные комплексы, флюоресцирующая группировка становится неповоротливой, и подобно большому флюорофору излучает поляризованный свет.

Поляризация флюоресценции используется для определения лекарств, наркотиков и других малых молекул иммунохимическим методом. Методика основана на конкуренции между исследуемым аналитом и мече-

ным флюорофором эталоном за ограниченное количество связывающих мест на антителе. Если исследуемого аналита в пробе мало, образуется много меченого флюорофором неповоротливого комплекса антиген-антитело и степень деполяризации мала. Наоборот, если концентрация аналита в пробе велика, образуется мало меченого флюорофором комплекса антиген-антитело и деполяризация будет значительна. Преимущество этого метода в том, что связанный флюорофор не надо отделять от свободного, отпадает необходимость в многократных отмываниях и т.д. поэтому методику называют гомогенной иммунопробой.

Флюоресценция с разрешением во времени.

Чувствительность *флюоресцентных методов в значительной степени* зависит от помех, вызванных тем, что свет возбуждения примешивается к свету эмиссии, а также неспецифической флюоресценцией исследуемого биологического объекта. Если сдвиг Стокса (т.е. различие в длинах волн света возбуждения и эмиссии) велик, помехи меньше как потому, что удается «уйти» от света возбуждения флюоресценции, так и потому что у неспецифической флюоресценции сдвиг Стокса мал. Помехи можно уменьшить и используя временную задержку (разрешение во времени) - возбуждать флюоресценцию короткими импульсами света, а измерять ее через некоторое время, когда возбуждающий импульс уже угас. Разумеется, технически это осуществимо только при условии, что время флюоресценции флюорофора велико. На этом основана ФРВ - флюоресценции с разрешением во времени - по английски time-resolved fluorometry (TRF).

Используя ФРВ, удается создать флюоресцентные метки с чувствительностью и избирательностью намного более высокими, чем у органических красителей, например, флюоресцеина, эти метки по чувствительности приближаются к радиоактивным. В качестве флюорофоров используются лантаниды - редкоземельные элементы (№ № 58-71 по таблице Менделеева): самарий(Sm), европий (Eu), тербий (Tb) и др. Для них сдвиг Стокса измеряется сотнями нанометров, а время флюоресценции сотнями микросекунд, что во много раз больше, чем у обычных флюорофоров(рис.35 а, б ; табл. 14).

Измеряя флюоресценцию на разных длинах волн и через разные промежутки времени после освещения импульсом возбуждающего света, можно одновременно количественно определять несколько флюорофоров этой группы (рис. 36). Это позволяет использовать двойные метки - например, одновременно пометить и измерять концентрации и антигена и антитела, что значительно повышает точность определения. Принцип флюоромет-

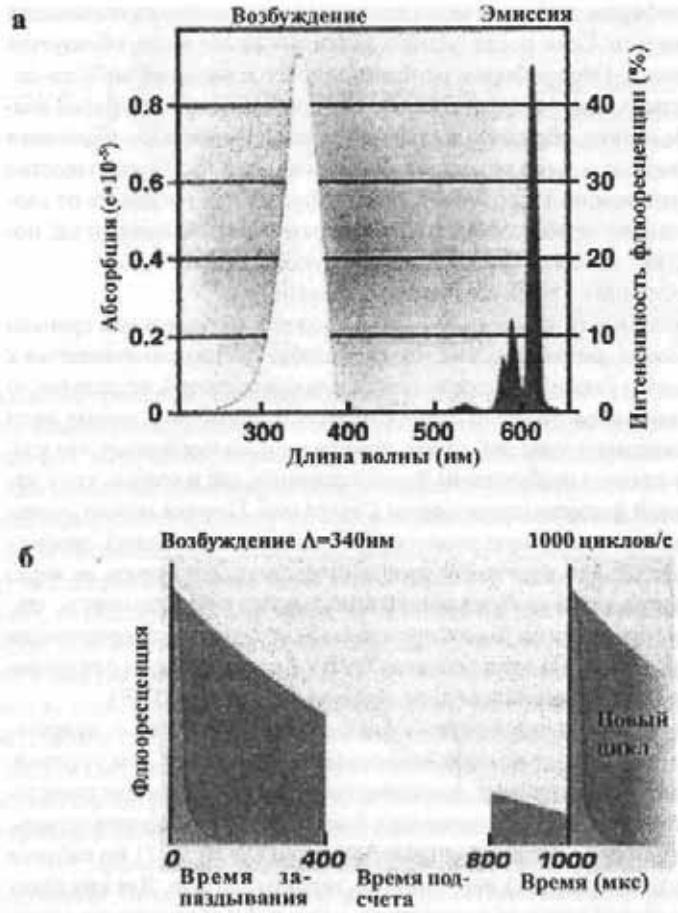


Рис. 35. Спектральные основы флюорометрии с разрешением во времени. **а** Широкий сдвиг Стокса и узкий пик эмиссии - свойства хелатов лантанидов как флюорофоров - создают отчетливое отделение спектра света возбуждения от спектра света эмиссии (на 200-300 нм). **б** Флюоресценция хелатов лантанидов длится в 200000 раз дольше флюоресценции обычных флюорофоров. Измерение при флуорометрии с разрешением во времени осуществляется гораздо позже затухания флюоресценции остальных веществ. (по материалам фирмы «Wallac»).

Таблица 14

Сравнительная характеристика немедленной флюоресценции и флюорометрии с разрешением во времени

	Немедленная флюоресценция	*Флюорометрия с разрешением во времени*
Флюорофор	Флюоресцеин	Хелат европия
Сдвиг Стокса (нм)	25	273
Время запаздывания (нсек)	3	730000
Ширина полосы эмиссии	широкая	узкая
Интерференция неспецифической флюоресценции	высокая	низкая

рии с разрешением во времени используется в аналитической системе Delfia («Wallac», Финляндия), в системе Kryptor («CIS Dignostic»).

Принцип связывания флюорофора с биологическими макромолекулами используется в иммунофлюоресцентном анализе (метка флюорофором антитела) в проточной иммуноцитофотометрии (метка флюорофором лимфоцитов и определение их подклассов с помощью меченых моноклональных антител).

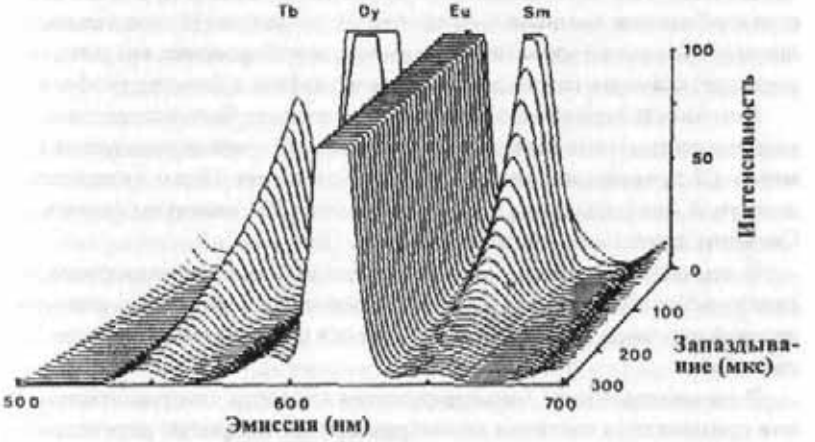


Рис. 36. Профиль запаздывания эмиссии при возбуждении флюоресценции в *растворе смеси Tb , Dy, Eu , Sm (Hemmila, 1988).*

Хемилюминесценция.

Свечение молекул, перешедших в возбужденное состояние в результате химической реакции, называется хемилюминесценцией. Чаще всего ее вызывают, окисляя определенные органические вещества перекисью водорода, гипохлоридом, молекулярным кислородом.

Специальная форма хемилюминесценции биологического материала, когда каталитический белок, например, люцифераза, повышает эффективность люминесцентной реакции, называется биолюминесценцией. Чувствительность определения с помощью биоломинесценции выше, чем при прямом флюоресцентном исследовании, и сравнима с чувствительностью иммунных проб. Для измерения люминесценции используются люминометры.

Принцип хемилюминесцентной детекции реализуется в вариантах хемилюминесцентных методик и хемилюминесцентной детекции ферментных меток в иммунохимических исследованиях. Основными хемилюминесцентными метками служат сульфонамиды и эфиры акридина, инициаторами их свечения выступает смесь перекиси водорода и гидроокиси натрия. Вспышки длительностью до 5 сек регистрируются , предел детекции эфира акридина 0,5 аттомолей ($5 \cdot 10^{-18}$).

Хемилюминесцентная детекция ферментных методик чувствительнее и удобнее колориметрической или флюоресцентной детекции. При хемилюминесцентном исследовании активности пероксидазы хрена используется комбинация люминол + окислитель + усилитель. В качестве последнего применяются ароматические амины, арилбороновые кислоты, гидроксиацетанимиды, гидроксибензотиазолы, нафтолы, фенолы, тиофенолы.

Активность щелочной фосфатазы также может быть исследована хемилюминесцентным методом. В качестве субстрата используется адаматил-1,2-диоксиэтан-арилфосфатные соединения. Порог определения щелочной фосфотазы при этом 1 цептимоль (602 молекулы фермента). Свечение длительное - более 30-60 мин.

В хемилюминесцентном варианте методики определения глюкозоксидазы используется смесь изолюминола и микропероксидазы для определения перекиси водорода, образующейся под действием фермента на глюкозу.

В люминесцентном канализирующем кислород иммуноисследовании применяются частички диаметром 250 нм, покрытые антителами и наполненные смесью предшественника хемилюминесцирующего соединения и флюорофора. В результате реакции антиген-антитело образует-

ся комплекс двух типов частиц. Свет лазера генерирует на поверхности частицы синглентный кислород, который диффундирует вглубь частицы, реагирует с предшественником флюорофора, образуя 1,2-диоксиэтан. Флюорофор испускает свет на длине волны 613 нм. На изолированных частицах этого не происходит, порог определения до десятитысячных мМоль/л, время анализа 10-12 мин.

Еще одним вариантом является электрохемилюминесценция, представляющая собой процесс возникновения свечения, при котором высоко реактивные соединения, способные испускать свет, образуются из стабильных предшественников на поверхности электрода, к которому приложен положительный потенциал. Для этого могут использоваться соединения рутения, осмия, рения и других элементов. В электрохемилюминесцентном методе, который реализуется на приборах Elecsys («Roche Diagnostics»), в качестве метки применяется комплекс рутений (II)-трис (*бипиредил*)$_3^{2+}$ NHS эфир, *который способен сопрягаться с аминогруппами* белков, гаптенов и нуклеиновых кислот. Бипиридиловые лиганды могут легко преобразовываться в форму активных хемилюминесцентных соединений.

Моноклональные антитела, меченые рутением, сопрягаются с исследуемым антигеном, который захвачен другими моноклональными антителами, связанными с биотином и за счет стрептавидина прочно связанными с магнитными шариками диаметром 2,8 мкм (рис. 37 а). Под влиянием магнита магнитные частицы с иммунным комплексом, меченым рутением, привлекаются в зону контакта с рабочим электродом, в результате чего развивается электрохемилюминесцентная реакция, интенсивность которой регистрируется фотоумножителем (рис. 37б).

Последовательность происходящих на поверхности положительного электрода процессов такова : окисляющийся под влиянием заряда электрода трипропиламин (ТПА) высвобождает протон и становится нестабильным радикалом, который, в свою очередь, отдавая электрон образовавшемуся при контакте с электродом трехвалентному рутениевому бипиридилу, переводит его в возбужденную форму, способную, испустив фотон света с длиной волны 620 нм, возвратиться в исходное стабильное состояние(рис. 37 в) . Как видно из этого описания, имеет место хемилюминесцентная реакция, инициируемая электрическим зарядом электрода, что и дало название этому методу.

В таблице 15 приведены технические характеристики некоторых флюорометров и люминометров отечественного и зарубежного производства.

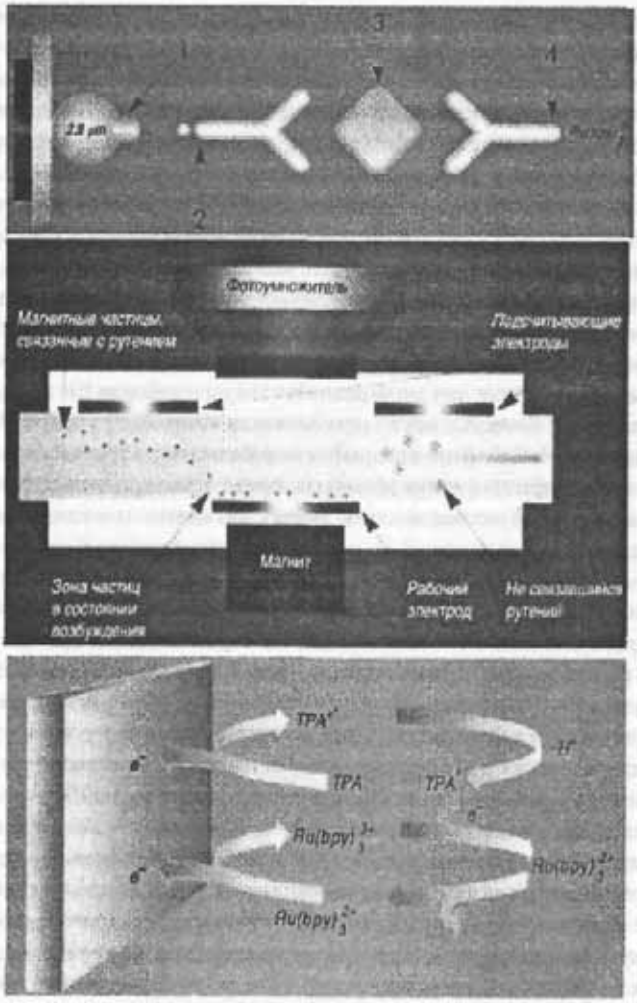


Рис. 37. Принципы электрохемилюминесцентного определения в приборе Elecsys («Roche Diagnostics»).

а Схема связывания исследуемого антигена. 1. Магнитные микрочастицы, покрытые стрептавидином. 2. Моноклональные антитела, связанные с биотином. 3. Исследуемый антиген. 4. Моноклональные антитела, меченые рутением. **б** Схема измерительной части прибора. **в** Принцип электрохемилюминесцентной реакции.

Нефелометрические методы

Нефелометрия, так же как и флюорометрия, изучает свечение, которое возникает при освещении исследуемого объекта внешним источником, однако в данном случае речь идет не о новом излучении, а о рассеивании света. Поэтому длины волн света возбуждения и излучения при нефелометрии практически совпадают. В конструктивном отношении флюорометр и нефелометр очень похожи и, в определенных случаях, может использоваться один и тот же прибор.

В клинической лабораторной диагностике нефелометрия применяется для определения количества частиц, выпавших в осадок - мутности раствора. Чаще всего речь идет о количественном определении белков по интенсивности преципитата после проведения реакции антиген-антитело, но метод находит применение также при выполнении осадочных проб и очень редко в других случаях.

Интенсивность светорассеивания можно оценивать двояко - либо по количеству рассеянного света, либо по ослаблению прошедшего. В первом случае говорят о нефелометрии, во втором о турбидиметрии (Рис. 38). Преимущество нефелометрии в том, что могут быть уловлены как очень маленькие, так и очень большие величины рассеянного света. Если раствор прозрачен, постороннего светорассеивания практически нет, чувствительность нефелометрического датчика можно сделать очень высокой, соответственно будет уловлено появление очень небольшого сигнала. С другой стороны, если рассеивание велико, чувствительность можно понизить так, чтобы все величины укладывались в шкалу прибора. Иное дело турбидиметрия, где измеряется процент прошедшего света - здесь чувствительность должна быть постоянной, она определяется силой света при измерении фона, поэтому маленькие или, наоборот, большие степени светорассеивания нельзя точно измерить. Преимущество же турбидиметрии в том, что для нее не требуется специальный прибор, измерения могут быть выполнены на том же фотометре или анализаторе, на котором выполняются общебиохимические исследования.

Различают классическое (или релеевское) и рамановское рассеяния света. В первом случае говорят о «релеевской частице», которая по определенным законам рассеивает свет, не изменяя его длины волны, спектр рассеянного света в точности воспроизводит спектр падающего. Во втором случае длина волны несколько меняется, в результате чего появляются дополнительные симметричные спектральные линии - с меньшей и большей длинами волн по отношению к возбуждающей.

Таблица 15

Сравнительная характеристика некоторых флюорометров

Наименование прибора, фирма-изготовитель, страна	Анализатор АКЛ-01 ЗОНД, НИИ физ.-хим. медицины, НИМВЦ ЗОНД, Россия	Анализатор флуориметрический FL 2110, АО НТЦ "SOLAR", Беларусь	Анализатор ФЛУОРАТ-02 АБЛФ НПФ аналитического приборостроения "ЛЮМЭКС", Россия	Планшетный флуорометр Fluoroscan Ascent, Labsystems, Финляндия
Источник света, спектральное деление, детектор	галогеновая лампа, светофильтры	вольфрамовая галогеновая лампа, светофильтры	импульсная ксеноновая лампа высокого давления, светофильтры	кварцевая галогеновая лампа, светофильтры макс. по 8шт. в каждом колесе, фотоумножитель
Спектральный диапазон, нм -возбуждения -флуоресценции	400-480 500-600	400-1100	340-470 470-590	320-700 360-800
Объем реакц. смеси для измерения, мкл	1500	1000	1000	50-300
Тип кюветы, Путь света, мм	прямоугольная, 10мм	сменная, квадратная	-"-, 10мм,	Любые в формате микропланшета от 1до 384 ячеек, кюветы и планшеты Терасаки, чашки Петри
Время измерения, с производительность, ан/час	5с, 120ан/ч			15с-25с/96-луночный планшет
Способ выдачи результатов	дисплей	дисплей прибора, дисплей ПК, принтер *внешний*	дисплей, принтер	дисплей ПК с программным обеспечением Ascent, внешний принтер

Анализатор АКЛ-01 Используются специальные флуоресцентные зонды для холестерина и триглицеридов и для альбумина. 25 мкл сыворотки для холестерина и триглицеридов, 15 мкл -для альбумина.

Анализатор флуориметрический FL 2110 Применяется для определения липидов, белков и др. биотехнологических, токсикологических исследований. Ручная смена светофильтров, сменное кюветное отделение, термостатирование при измерении (37°С±0,5°С)

Анализатор ФЛУОРАТ-02 АБЛФ Имеется вариант анализатора в зависимости от задач лаборатории - фотометр-флуориметр-хемилюминометр При оснащении проточной кюветой ФЛУОРАТ-02 используется как флуориметрический детектор в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Переносные варианты флуорометров, работают от батареи 12 в, что позволяет использовать их в составе передвижных лабораторий.

Наименование прибора, фирма-изготовитель, страна	Fluoroscan Ascent CF, Labsystems, Финляндия	Fluoroscan Ascent FL, Labsystems, Финляндия	1420 VICTOR, WALLAC OY, Финляндия	Флуорометр 1234 DELFIA, WALLAC OY, Финляндия
Источник света, спектральное деление, детектор	Как Fluoroscan Ascent	кварцевая галогеновая лампа, светофильтры	1.вольфрамово-галогеновая лампа; 2.*ксеноновая пульсирующая лампа для из*мерения разрешающей во времени флуоресценции света; светофильтры, детекторы – фотоумножитель для люминометрии, флуорометрии и разрешающей во времени флуорометрии; инфракрасный фотоумножитель; ультрафиолетовые фотодиоды.	
Спектральный диапазон, нм -возбуждения -флуоресценции	320-700 360-800 стандартная пара светофильтров 485/527	320-620 360-670	390-590 450-665, фотометрия: 350-700	340-650
Объем реакционной смеси для измерения, мкл	как Fluoroscan Ascent	как Fluoroscan Ascent		
Тип кюветы, длина пути света, мм	как Fluoroscan Ascent	измерения оптимизированы для 96- и 384 –луночных планшетов	все типы микропланшетов, с количеством ячеек до 864, могут быть использованы чашки Петри, фильтры и планшеты Терасаки, планшеты с фильтрами и мембранами, прозрачные, черного, белого цвета	96-луночные микропланшеты
Время измерения, с произво-дительность ,ан/час	как Fluoroscan Ascent	как Fluoroscan Ascent	может быть избрано для ячейки или ряда ячеек в интервале 0,1-600 с	180с/96 луночный планшет
Способ выдачи результатов	как Fluoroscan Ascent	как Fluoroscan Ascent	дисплей ПК, внешний принтер	встроенный дисплей, или дисплей ПК с внешним принтером

Планшетный флуорометр Fluoroscan Ascent Применяется для определения катехоламинов, фенилаланина, серотонина, гистамина, порфиринов, витаминов. Модульная полуавтоматическая система, с встроенным термостатированием до 45°С и встроенным орбитальным встряхивателем и диспенсерами; вертикальная флуориметрия, 1-лучевая, 2-лучевая, возможно автоматическое переключение луча света в направлении снизу вверх или сверху вниз, кинетическое сканирование, автокалибровка, калибраторы флуоресценции на борту. Область применения: неонатальный скрининг, фенилаланин, ТТГ, Т4, антитела против токсоплазмы, определение внутриклеточного иона кальция, микробиологические, молекулярно-биологические исследования. Планшеты прозрачные, белого и черного цвета, планшеты с дном – фильтром. У новорожденных исследование проводится в высушенных на фильтровальной бумаге пятнах крови. Чувствительность по флуоресценну 0,01 пикомоль/на ячейку 96-луночного планшета черного цвета.

Fluoroscan Ascent CF. Применяется для исследования клеток: цитотоксичности, пролиферации, адгезии, определение ДНК, подсчет бактерий, определения лекарств, генетических, микробиологических исследований, иммунологических исследований гормонов, факторов роста, компонентов комплемента; количественного определения продуктов ПЦР, исследования экспрессии ДНК, определения РНК. Вертикальная фотометрия, направление хода луча от дна к верхнему краю ячейки. Чувствительность по флуоресценну <0,05 пикомоль/ячейку в прозрачных 96-луночных планшетах.

Fluoroscan Ascent FL. Комбинированный флуорометр и люминометр. До 3-х диспенсеров, орбитальный встряхиватель на борту; термостатирование при измерении (комнатная температура + 3 - +45°С). Вертикальная фотометрия в направлении луча света снизу вверх или сверху вниз; выбор различного диаметра луча - 3мм или 1,5 мм в зависимости от размера лунок в планшете. Чувствительность по флуоресценну: 0,01 пикомоль/ячейку; по АТФ –5фемтомоль /ячейку. Все флуорометры совместимы с роботизированными системами пробоподготовки и выполнения анализа.

1420 VICTOR. Применяется для исследования клеток: цитотоксичности, жизнеспособности, количества клеток, пролиферации, адгезии, захвата кальция, фагоцитоза в генетических исследованиях рецепторов, для иммунологических исследований; ферментов; молекулярно-биологических исследований: количественного определения продуктов ПЦР, определения ДНК, экспрессии генов, гибридизации; лекарственного скрининга. Многофункциональный полуавтоматический анализатор, позволяющий использовать реактивы со многими нерадиоактивными метками, работает как фотометр, люминометр и флуорометр, измеряющий различные виды флуоресценции, включая разрешающую во времени флуоресценцию. В последнем случае могут быть использованы хелаты 4-х лантанидов: европия, самария, диспрозия и тербия. Чувствительность: флуориметрия- по флуоресценну -<10 фемтомоль/ячейку, умбелиферрону- <200фемтомоль /ячейку; разрешающая во времени флуорометрия -европий < 12 аттомоль/ячейку; люминометрия -АТФ- типично 80 аттомоль/ячейку. Автоматическая установка длины волны, встроенное термостатирование, опции с диспенсерами, интеграция с роботом и различными персональными компьютерами.

Флуорометр 1234 DELFIA. Применяется для неонатального скрининга, определения свободных и общих Т3,Т4,ТТГ,ТСГ, кортизола ХГ,ЛГ,ФСГ, половых гормонов, глобулина, связывающего половые гормоны, ферритина, фолата, B_{12}, иммунореактивного трипсина, раковоэмбрионального антигена, α-фетопротеина. Полуавтоматическая система. Метод основан на измерении разрешающей во времени флуоресценции хелатов лантаноидов (европия, самария, тербия). При работе on line с ПК используют программное обеспечение MultiCale.

Сравнительная характеристика некоторых люминометров

Наименование прибора, фирма-изготовитель, страна	Люминометр Luminoscan TL (TL PLUS), Labsystems, Финляндия	Люминометр для микропланшетов Luminoscan, Ascent, Labsystems, Финляндия	Люминометр, Lumat, LB 9507, WALLAC, OY, Финляндия	Люминометр Micro Lumat LB 96P, WALLAC OY, Финляндия	Люминометр/фотометр Antos Lucy 1, Antos Labtec Instruments Gmbh, Австрия
Источник света, спектральное деление, детектор	детектор–фотоумножитель с боковым окном				4 люминометрических фильтра
Спектральный диапазон возбуждения флуоресценции, нм	длина волны люминесценции, нм: люминол-425, акридинэфир-460, экворин-469, AMPPD-470, бактериальная люцифераза-490, АТФ люцифераза, люциферин-562	270-680, до 6 светофильтров			300-700
Объем реакц. смеси для измерения, мкл					50-300
Тип кюветы, Путь света, мм	сменная, круглая12х50 мм	любые планшеты 1-384-луночные, *чашки Петри ∅ до* 90мм, планшеты Тарасаки (более 40 вариантов обычно используемых микропланшетов)	круглые пробирки	любые в формате*96 луночных планшетов прозрачные, белые, черные; можно использовать фильтры с люблотов для измерения люминесценции	Любые в формате микропланшета, планшеты с дном-фильтром
Время измерения, с производительность, ан/час	1с (0,1-100с)	15с/96 -луночный планшет в режиме сканирования			
Способ выдачи результатов	Дисплей, внешний принтер	дисплей ПК, внешний принтер	дисплей, встроенный принтер	дисплей, внешний принтер, ПК	

Люминометр Luminoscan TL. Применяется для генетических исследований, исследований АТФ в экстрактах клеток, использования ДНК-зондов, тест цитотоксичности,пролиферации клеток, для обнаружения и дифференциации вирусов и бактерий, определения чувствительности бактерий к антибиотикам, фагоцитоза, гормонов, диагностики маститов. Миниатюрный портативный анализатор измерения хеми- и биолюминесценции в пробирках,чувствительность 0,8 фемтомоль АТФ. Анализатор Luminoscan TL Plus оснащен встроенным диспенсером реактивов (опция), имеет встроенный микропроцессор для расчета при различных способах измерения, записи и хранения результатов (97 протоколов методов и 999 отвстов может храниться в памяти прибора), внешний принтер, чувствительность –0.05 фемтомоль АТФ / анализ.

Люминометр для микропланшетов Luminoscan, Ascent. Применяется для измерения био-и хемилюминесценции в генетических исследованиях, при определении АТФ, ферментов и акридиновой, 1-или 2-диоксетановой, люминоловой и др. меток, фагоцитоза, продуктов ПЦР, точки мутаций и амплифицированной ДНК вирусов, в микробиологических исследованиях, иммуноферментных (пероксидаза, щелочная фосфатаза) исследованиях с люминесцентными субстратами. Высокопроизводительный люминометр: до 3-х встроенных диспенсеров реактивов,1- непосредственно в позиции измерения, термостатируемый инкубатор и орбитальный встряхиватель. Совместимость с роботизированными устройствами для пробоподготовки, а также с HIS/LIS системами. Программное обеспечение позволяет выполнять одно-двухволновые измерения, быстрые кинетические измерения, сканирование многоточечные измерения и заводской жидкие планшеты, анализ в режиме "cut-off", расчет результатов по калибровочным кривым по принципу линейной регрессии, кубическому сплайну, четырехпараметровой логистике, от точки к точке. Чувствительность –1фемтомоль/лунку.

Люминометр, Lumat, LB 9507. Применяется для исследования генов, люминесцентного иммунохимического анализа, исследований, основанных на анализе АТФ. Наиболее полная генерация полуавтоматических люминометров. Чувствительность –до 20 аттомолей АТФ.

Люминометр Micro Lumat LB 96P. Применяется для различных видов люминесцентного иммунохимического анализа. Люминометр имеет встроенный инжектор для дозирования реактивов в реакционную смесь перед измерением люминесценции, автоматическое термостатирование при иммуноферментных реакциях или измерении люминесценции клеток. Открытая система для люминесцентного планшетного анализа.

Люминометр/фотометр Antos Lucy 1. Применяется для био-хемилюминесцентных исследований (определение АТФ, генная инженерия, фагоцитоз, иммунология). Встроенные диспенсеры (10-1000 мкл с шагом 1мкл), термостатирование при температуре на 4 °С ниже комнатной до 40 °С.

Классическая теория светорассеивания, разработанная Релеем, рассматривает случай, когда размер рассеивающей частицы мал по сравнению с длиной волны, составляя 1/10 ее часть или меньше. Для фиолетового света с длиной волны 400 нм это составляет 40 нм, а в красном свете с длиной волны 700 нм рассеяние света происходит в соответствии с открытыми Релеем закономерностями, если размер частицы меньше 70 нм. Наибольший диаметр молекулы альбумина 8 нм, IgG - 20 нм, а длина нити фибриногена 50 нм. Таким образом частица агрегата антиген-антитело, состоящая из нескольких молекул исследуемого белка и антител, в ряде случаев укладывается в размеры релеевской частицы и обладает ее свойствами.

Интенсивность релеевского светорассеяния зависит от длины волны света и угла, под которым измеряется рассеянный свет по отношению к

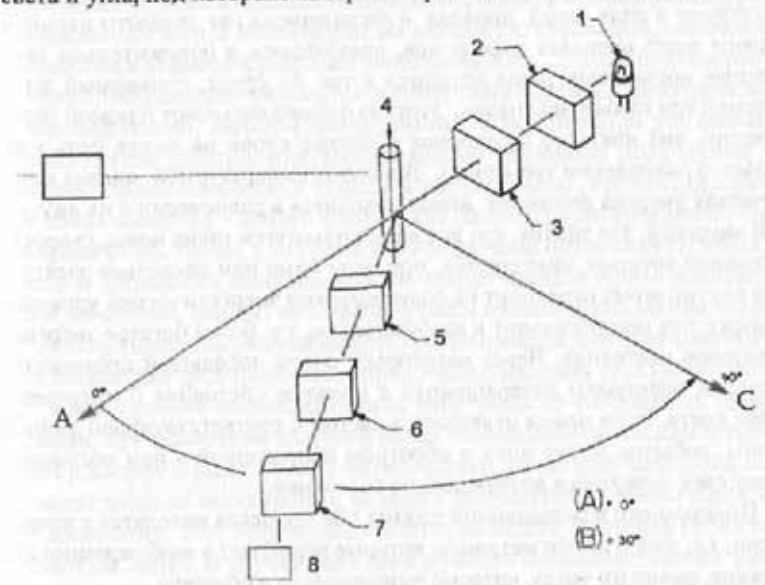


Рис. 38. Схема устройства турбидиметра и нефелометра.
А. Ход луча при измерении мутности (турбидиметрия). **В.** Ход луча при определении рассеяния света в прямом направлении (нефелометрия). **С.** Ход луча при измерении рассеяния света под прямым углом (нефелометрия).**1.** Источник света. **2.** Оптическая система света возбуждения. **3.** Светофильтр света возбуждения. **4.** Кювета с исследуемым материалом. **5.** Оптическая система рассеянного света. **6.** Светофильтр детектора. **7.** Детектор. **8.** Измерительный прибор.

падающему: оно обратно пропорционально 4 степени длины волны, большая часть энергии рассеивается вперед и назад по отношению к ходу луча. Чем больше частица, тем большая доля света рассеивается вперед, по ходу луча. Поэтому в ряде случаев выгоднее измерять свет, рассеянный не вбок (т.е. под углом 90° к падающему лучу), а под меньшими углами, что повышает чувствительность. В этом случае возбуждающий луч должен быть узконаправленным, что лучше всего обеспечивается лазером. Это послужило причиной появления семейства лазерных нефелометров. Однако в последнее время они успешно вытесняются приборами с ксеноновыми лампами и светодиодами.

Эмиссионные спектральные методы

Атомы химических элементов - металлов, которые в растворе присутствуют в виде солей, попадая в раскаленный газ горячего пламени, теряют часть внешних электронов, превращаясь в положительно заряженные ионы. Электроны остаются в той же среде, суммарный заряд которой тем самым нейтрален. Этот газ физики называют плазмой (естественно, она никакого отношения к плазме крови не имеет, речь идет только о совпадении терминов). В высокотемпературной плазме кинетическая энергия движения ионов находится в равновесии с их внутренней энергией, это значит, что все время находятся такие ионы, скорость движения которых замедляется, при этом один или несколько электронов внутри атома переходит на более высокий энергетический уровень - говорят, что ион переходит в возбужденное, т.е. более богатое энергией квантовое состояние. Через некоторый, очень небольшой промежуток времени, электроны возвращаются в прежнее состояние и излучается квант света. Если пламя освещается светом с соответствующей длиной волны, события могут идти в обратном направлении - ион поглощает квант свет, переходя в возбужденное состояние.

Практически в раскаленной плазме оба процесса находятся в равновесии, т.е. число ионов металлов, которые переходят в возбужденное состояние, равно их числу, которое возвращается в обычное.

Возможные энергетические уровни атомов, их так называемые квантовые состояния, строго детерминированы, различия между ними в точности равны энергии кванта поглощенного или излучаемого света. А, как известно, эта энергия однозначно связана с длиной волны. Поэтому переход из одного энергетического состояния в другое сопряжен с испусканием или поглощением света совершенно определенной, строго фиксирован-

ной длины волны. Поскольку в составе большинства атомов много электронов, теоретически возможно большое число разных энергетических уровней, (т.е. разных степеней возбуждения атома), соответственно атом может излучать свет с разными длинами волн. Однако при реальных температурах пламени в аналитических приборах речь идет только об одном, самом низком уровне возбуждения, соответственно и об одной длины волны эмитируемого(излучаемого) или поглощаемого света.

Способность находящихся в плазме ионов испускать и поглощать кванты света используется в двух аналитических методах - пламенной фотометрии и атомной абсорбциометрии. В первом случае речь идет об эмиссии (излучении) света, во втором - о его поглощении.

Спектральные методы - и фотометрия пламени, и атомная абсорбция - позволяют определить общее содержание элемента в исследуемой пробе, независимо от того, в какой форме он находится: свободной, связанной с белком или низкомолекулярным веществом и т.д. В этом принципиальное различие результатов спектроскопического и потенциометрического (ионселективного) методов исследования. Одновременно это большое преимущество спектроскопического метода, поскольку полученные результаты в большей степени являются абсолютными , так как спектральная линия элемента - это его физическая константа, которая может быть измерена очень точно, в то время как измеренная потенциометрическим методом активность иона, во-первых, всегда меньше общей концентрации и, во вторых, зависит от большего числа привходящих обстоятельств. По этой причине на международном уровне имеется договоренность считать эталонным (референтным, справочным) методом спектроскопический и калибровать ионоселективные электроды по его данным. Иными словами, при измерении натрия и калия потенциометрическим методом прибор должен выдавать такие же результаты, какие получились бы, если бы исследование выполнялось методом фотометрии пламени или атомной абсорбции. Это, безусловно, непростая задача, о которой более подробно - см. ниже. В случае сомнения в работе ионоселективного электрода или калибровочного раствора, по которому этот электрод калибруется, судьей должен быть спектральный метод.

Пламенная фотометрия.

Находящиеся в раскаленной плазме ионы атомов, переходя из возбужденного состояния в невозбужденное, излучают свет, состоящий из одной или нескольких узких спектральных линий разной интенсивности (это зависит главным образом от температуры), что визуально восприни-

мается как окрашивание пламени. Так, линия натрия имеет длину волны 589 нм и окрашивает пламя в желтый цвет, магний в красный, калий в фиолетовый, рубидий в красный, магний в голубой. Если в пламени присутствует несколько элементов, более интенсивная линия делает менее интенсивные практически невидимыми, что, конечно, создает помехи при анализе. Возникают они и вследствии диффузного или фонового свечения, которое наблюдается на месте линии и в отсутствие излучающего ее иона.

Количество ионов в пламени невелико, а среди них возбужденные составляют лишь несколько процентов, однако этого достаточно, чтобы выполнить измерения.

Пламенный фотометр - это прибор, который позволяет использовать эмиссию (свечение) плазмы для определения концентраций в ней излучающих химических элементов. Он состоит из: системы подачи газов - горючего газа и поддерживающего горение воздуха или воздушно-кислородной смеси, эжектора (смесителя), горелки, монохроматора, фотоприемника, измерительного устройства (рис.39). В поток воздуха или воздушно-кислородной смеси с помощью эжектора засасывается раствор, содержащий исследуемое вещество. По принципу работы эжектор напоминает пульверизатор - он засасывает исследуемый раствор и распыляет его с образованием множества мелких капелек. Большая часть их тут же оседает на стенках и накапливается на дне сосуда, а небольшая, в виде очень мелкой взвеси поступает в горелку, где смешивается с горючим газом. В спектре излучаемого горелкой света на общем фоне видны узкие спектральные линии исследуемых элементов, ширина каждой из ко-

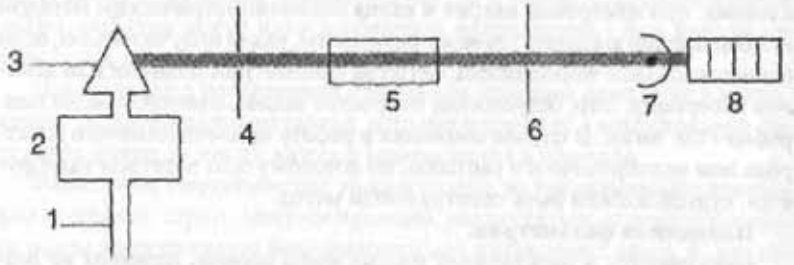


Рис. 39. Схема устройства пламенного фотометра.
1. Аспиратор. 2. Распылитель. 3. Пламя горелки. 4. Щель на входе. 5. Монохроматор (светофильтр). 6. Щель на выходе. 7. Детектор. 8. Измерительный прибор.

торых зависит от условий возбуждения, составляя несколько нанометров. Свет нужных линий выделяется монохроматором и попадает на фотоприемник, регистрирующий его интенсивность.

Таковы основные элементы любого пламенного фотометра. Помимо них прибор может быть снабжен различными сервисными устройствами - электрическим зажиганием газа, системой автоматической подачи и разведения проб, печатающим устройством и др.

Система подачи газа состоит из линии горючего газа и линии воздуха. В качестве горючего газа можно использовать бытовой газ - метан, но он не дает высокотемпературного пламени, что очень ограничивает перечень определяемых элементов. Бутан или пропан, обеспечивает более высокую температуру, но самое горячее пламя получается при сгорании ацетилена. Горючий газ подается в прибор из баллона через систему редукторов давления и, если надо, очистки. Воздух обычно поступает из компрессора, но его источником могут быть и баллоны с соответствующей системой редукторов. Чтобы обеспечить равномерное свечение пламени надо поддерживать давление и горючего газа, и воздуха с высокой точностью, всякое его изменение сказывается на калибровке, которую надо переделывать после новой регулировки прибора. Обычно давление газа на входе прибора, после редукторов, составляет несколько сантиметров водяного столба, а давление воздуха значительно выше, так как оно обеспечивает еще и эжекцию исследуемого раствора.

Работая с пламенным фотометром нельзя забывать, что это источник повышенной опасности, неправильное обращение с которым может привести к пожару или даже взрыву. Включая прибор, надо сначала включить воздушную магистраль, а затем уже газовую, иначе газ может проникнуть в воздушную систему и, смешиваясь с воздухом, образовать взрывоопасную смесь.

В результате работы эжектора образуется тонкая взвесь капелек жидкости, большая часть которых тут же оседает, стекая по стенкам и через водяной запор удаляется. Считается, что в горелку попадает всего 5-10% исследуемого материала, но этого вполне достаточно, чтобы создать интенсивное свечение. Водяной запор обеспечивает небольшое превышение давления воздуха в распылителе над давлением газа, благодаря чему собственно воздух и поступает в горелку. Если этой разности давлений нет, газ из горелки может проникнуть в эжектор, где накопится взрывоопасная смесь. По этой причине, работая с прибором, надо все время следить, чтобы водяной запор был заполнен.

Важная часть пламенного фотометра - это монохроматическое устройство, которое выделяет нужный спектральный интервал. Необходимость в этом возникает потому, что в исследуемом материале обычно присутствует несколько химических элементов, спектральные линии которых могут оказаться достаточно близко друг от друга. Другая причина - это фоновое свечение, т.е. то, которое наблюдается в отсутствии исследуемого элемента на месте его линии. Чем уже спектральный участок, который выделяет монохроматор, тем меньше суммарная интенсивность фонового свечения, тем меньше помех в работе. В идеальном случае монохроматор должен выделять только участок, который соответствует ширине измеряемой спектральной линии, т.е. в несколько нанометров.

Есть несколько возможных схем работы пламенного фотометра. В самом простом случае, который обычно и практикуется при определении натрия или калия в сыворотке крови или моче, исследуемый материал разводят водой в 50 или 100 раз и сжигают в пламенном фотометре. Эмитируемый свет, проходя через светофильтр, попадает на фотоприемник, сигнал которого пропорционален количеству исследуемого элемента. Такое прямое измерение оказывается эффективным только, если исследуемого элемента много и у него яркие линии, как в случае натрия. Если же концентрация исследуемого вещества невелика по сравнению с содержанием других элементов, спектральные линии которых более интенсивны и создают помехи при анализе, приходится использовать более сложные приемы. Эффективнее всего, конечно, иметь монохроматор, выделяющий узкую спектральную полосу, в точности соответствующую ширине линии, но такие монохроматоры дороги, светосила у них обычно невелика, поэтому необходимы более чувствительные и, соответственно более дорогие светоприемники.

В некоторых случаях используют так называемый компенсационный метод : одновременно выделяют два пучка света - один, который соответствует линии исследуемого элемента, второй - того элемента, который мешает определению, поскольку излучаемый им интенсивный свет создает помехи (для биологических жидкостей в таком положении оказывается натрий). Оба сигнала включаются друг навстречу другу, прибор фиксирует разность между ними, тем самым вводя поправку на концентрацию присутствующего в растворе натрия.

Используется и метод внутреннего стандарта, когда исследуемую биологическую жидкость разводят не водой, а раствором элемента, которого нет в биологическом материале, чаще всего солями лития. В процессе

анализа делают два измерения: на длине волны, характерной для линии определяемого элемента, и на длине волны линии внутреннего стандарта. Если показания стандарта отличаются от того, что было при калибровке, вносят соответствующую поправку и в измеряемую величину. Такой порядок работы позволяет избежать ошибок, связанных с нестандарными условиями распыления; особенно важно это при исследовании жидкостей, вязкость которых может значительно колебаться.

Точность пламенно-фотометрических методов исследования во многом зависит от условий распыления исследуемой жидкости и возбуждения пламени. Чтобы их стандартизировать, надо не только хорошо отрегулировать распылитель(эжектор), но и проследить, чтобы вязкость калибровочных и исследуемых растворов была одинаковой. Для этого в разводящие растворы рекомендуется добавлять соответствующие вещества .

В клинической лабораторной практике чаще всего определяют калий и натрий в сыворотке крови и в моче. Для этих анализов нет необходимости использовать ни методы внутреннего стандарта, ни разведения проб фоном, ни компенсации - достаточно правильно приготовить комплексный калибровочный раствор, который одновременно содержит и калий, и натрий в концентрациях близких к тем, которые бывают в исследуемом материале. Нельзя только забывать, что в плазме крови соотношение концентраций этих элементов другое, чем в моче, поэтому калибровочный раствор для мочи не подходит для анализа крови и наоборот.

Атомная абсорбционная спектроскопия (ААС).

Атомная абсорбционная спектроскопия или атомная абсорбциометрия - метод в известном смысле обратный пламенной фотометрии, поскольку здесь измеряется не излучение пламени (раскаленной плазмы), а наоборот, поглощение им света. Однако физические основы и того, и другого одни - очень избирательное взаимодействие иона в газовой фазе с квантом света. Оно заключается в том, что атомы каждого химического элемента поглощают и испускают только кванты света с определенной длиной волны. Поэтому, если через пламя проходит белый свет (например солнечный или от лампы накаливания), на спектрограмме будут заметны узкие темные полосы - линии, соответствующие спектральным линиям присутствующих в пламени элементов. Именно этим объясняются узкие, темные полосы в солнечном спектре - так называемые Фраунгоферовы линии.

ААС имеет то преимущество перед фотометрией пламени, что это фотометрический процесс, подчиняющийся закону Ламберта-Бера, он

лучше воспроизводим, меньше подвержен действию помех и поэтому точнее. Устойчивость к помехам объясняется еще и тем, что измеряется именно количество прошедшего света, поэтому если его источник монохроматический, излучающий только свет с определенной длиной волны, посторонние ионы не мешают определению - они могут поглотить только тот свет, которого в данном источнике нет. Это позволяет определять методом ААС самые незначительные примеси элементов в присутствии значительных концентраций веществ, которые сделали бы измерение методом фотометрии пламени невозможным.

В методе атомной абсорбциометрии источником света служит лампа, содержащая исследуемый элемент, так называемая лампа с полым катодом. Во время работы в ней идет электрический разряд, который возбуждает эти атомы, заставляя их светиться. В результате излучается свет в точности той длины волны, которая нужна для данного исследования (Рис. 40, 41). Так, например, для определения натрия, ионы которого, попадая в плазму, излучают и поглощают свет с длиной волны 589 нм, используется натриевая же лампа, излучающая свет именно с такой длиной волны. Это известное неудобство метода - для каждого химического элемента нужна своя лампа, которое однако, компенсируется его другими преимуществами. Практически оказывается, что метод ААС почти в 100 раз чувствительнее пламенной фотометрии и более избирателен.

Есть два способа перевести исследуемый элемент в газовую фазу для абсорбционного исследования. В первом случае, так же, как и в фотометрии пламени, используют горелку, в которой сжигается водород. Исследуемое вещество эжектируется (распыляется) в воздушный поток, с которым и поступает в горелку. Преимущество этого метода - более высокая температура и высокая концентрация исследуемого вещества, недостатки - относительно большие капли воды, попадая в пламя увеличивают количество рассеянного света, это так называемый «шум сжигания».

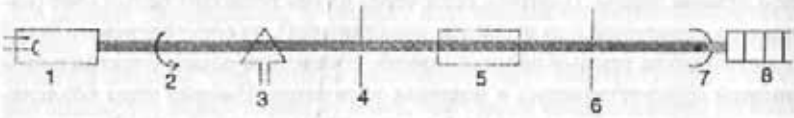


Рис. 40. Схема устройства атомно-абсорбционного спектрофотометра.**1**. Катод. **2**. Прерыватель. **3**. Пламя горелки. **4**. Щель на входе. **5**. Монохроматор. **6**. Щель на выходе. **7**. Детектор. **8**. Измерительное устройство.

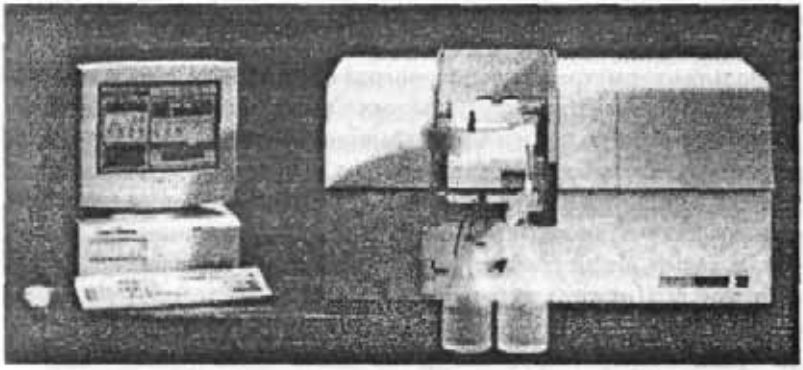


Рис. 41. Атомно-абсорбционный спектрофотометр AAnalyst 600 («Perkin Elmer»).

В другом варианте исследуемое вещество вносится в нагретую электричеством до высокой температуры графитовую трубку, которая в этом случае играет роль газовой кюветы (графитовая кювета). Тут нет больших капель, поэтому нет шума, оптический путь более длинный, что увеличивает чувствительность. Однако температура плазмы ниже, некоторые *металлокомплексы неадекватно диссоциируют.*

Электрохимические методы исследования

Наряду с оптическими методами, для измерения количества вещества в клинической лабораторной практике находят широкое применение и эдектрохимические методы, использующие процессы, которые происходят на электродах, погруженных в водный раствор. Сюда относятся все методы количественного или качественного анализа, использующие явления, происходящие на границе фаз. В зависимости от используемого эффекта и условий исследования различают несколько видов электрохимических методов.

Потенциометрия объединяет методы, основанные на измерении электродвижущих сил (потенциалов) обратимых элетрохимических реакций, протекающих на границе погруженных в раствор электродов. Обратимыми химическими реакциями называются такие, компоненты которых находятся в состоянии динамического химического равновесия, всякое изменение одной компоненты под влиянием внешних условий, вызывает изменение концентраций других компонент. Важными разновидностями *потенциометрии являются* pH-*метрия, а также ионселектив-*

ные электроды которым посвящены специальные разделы в этом разделе руководства.

Вольтамперметрия или полярография - метод анализа, в котором изучается зависимость между силой тока и напряжением на границе электрод-раствор. Здесь, как и в потенциометрии, изучаются процессы, происходящие на границе двух сред (фаз), но потенциометрическое исследование проводится в таких условиях, при которых сила тока ничтожна, а измеряется возникающая разность электрических потенциалов. В случае же вольтамперметрии разность электрических потенциалов на границе двух фаз (между электродом и исследуемым раствором) поддерживается постоянной, а измеряется сила проходящего тока.

Кулонометрия - метод анализа, основанный на измерении количества вещества, выделяющегося на электроде в результате электрохимической реакции. В соответствии с законом Фарадея количество вещества оценивается по количеству израсходованного электричества. При кулонометрии потенциал рабочего электрода отличается от равновесного значения.

Кондуктометрия - метод анализа, в котором о химическом составе раствора судят по электропроводности в межэлектродном пространстве. Электрохимический потенциал рабочего электрода не имеет значения, обычно измерения выполняются на переменном токе.

Особые виды измерительных устройств - это ***субстратно-селективные электроды***, каждый из которых представляет собой датчик концентрации, устроенный более сложно, чем просто «электрод», т.е. кусок металла. Дать точное определение этому понятию трудно, так как используются самые разные принципы, в целом можно определить субстратно-специфический электрод как устройство, электрические характеристики которого меняются, когда поверхность соприкасается с раствором, содержащим исследуемый аналит. В эту группу входят и ***ферментные электроды***, в которых имеется участок (слой) ,содержащий фермент, способный ускорять химическую реакцию, в которой аналит выступает в роли субстрата, а продукт реакции улавливается электрохимическим методом. Субстратно-специфические электроды могут быть как потенциометрическими, в том числе ионоселективными, так и полярографическими, четкой границы между субстратно-селективными и ион-селективными электродами нет, речь идет скорее о степени сложности конструкции.

К той же категории относятся и ***газоселективные электроды***, предназначенные для электрохимического определения растворенных в воде газообразных продуктов.

Полярография

В классическом варианте полярографии исследуется зависимость тока, протекающего через погруженный в раствор электрод, от величины приложенного электрического напряжения (потенциала). Величина потенциала обычно изменяется в диапазоне от положительного значения в несколько десятых вольта до отрицательного порядка двух вольт, записанная кривая называется полярограммой, она регистрируется прибором - полярографом. Большие отрицательные или положительные разности напряжений прилагать нельзя, так как начинается электролиз воды.

В специальных датчиках или приборах может измеряться сила тока только при одном, фиксированном значении потенциала. В полярографической ячейке всегда по крайней мере два электрода - рабочий, на котором собственно и происходят исследуемые процессы, и индифферентный электрод или электрод сравнения, который выбирается так, чтобы его характеристики по возможности не влияли на процессы, происходящие на рабочем электроде. В выпускаемых промышленностью для клинико-диагностических лабораторий полярографических датчиках в качестве индифферентного электрода обычно используется хлор-серебрянный, реже каломельный полуэлемент (см. ниже). Иногда используют более сложную электрическую схему, в которой есть еще третий - компенсационный электрод, разгружающий рабочий электрод от фонового (неспецифического) тока.

Электрохимическое существо метода заключается в том, что на рабочем электроде молекула исследуемого вещества восстанавливается (получает электрон), реже окисляется (теряет электрон), что обеспечивает прохождение электрического тока в цепи. Условия измерения подбираются так, чтобы величина тока определялась скоростью диффузии молекул к электроду , т.е. в конечном счете их концентрацией. Для молекулы каждого вещества характерна пороговая величина электродного потенциала, при которой она может отдать или получить электрон. Когда эта величина достигнута, ток в цепи усиливается, так как в процесс включается новый вид молекул или ионов. .

При постепенном увеличении электрического потенциала происходит характерный рост силы тока в цепи, называемый полярографической волной, ее форма позволяет судить о качественном и количественном составе раствора. Потенциал, соответствующий половине высоты волны, так называемый потенциал полуволны, является величиной, характерной для данного вещества, он зависит также от состава раствора (фона). Если в

растворе находятся несколько электрохимически активных веществ, т.е. способных обмениваться электронами с электродом, полярограмма представляет собой полярографическую кривую с отдельными подъемами (волнами), *каждая из которых соответствует какому-то определенному сорту молекул или ионов. Высоты полярографических волн пропорциональны концентрациям веществ, участвующих в реакциях на электроде.*

Для успешного воспроизведения полярографических эффектов большое значение имеет материал электрода, качество его поверхности и условия перемешивания раствора. Эти параметры хорошо стандартизуются в классическом варианте полярографии, использующем так называемый ртутный капельный электрод. В нем вытекающая из капилляра ртуть выполняет функцию рабочего отрицательного электрода (катода), поверхность которого непрерывно обновляется, одновременно растущая капля перемешивает раствор. Функцию второго электрода выполняет ртуть, разлитая на дне сосуда. По понятным причинам ртутный капельный электрод неудобен в работе, он используется главным образом в научных исследованиях, а для клинико-диагностических лабораторий разработаны и широко применяются специальные аналитические устройства с твердыми электродами, в которых не исследуется вся полярографическая кривая, а измеряется лишь сила тока при том значении потенциала, при котором аналит наиболее специфично участвует в электродных реакциях. Оптимальная величина потенциала зависит не только от свойств исследуемого вещества, но и от того, какой используется индифферентный электрод (электрод сравнения, полуэлемент) поскольку он сам генерирует определенную разность потенциалов по отношению к раствору. В ряде случаев складывается такая ситуация, что никакой внешний источник электрического напряжения не нужен, его функцию выполняет электродвижущая сила электрода сравнения..

На характер полярографической кривой, и, соответственно, силу тока при фиксированном напряжении, влияют не только свойства электрода и состав раствора, *но и присутствие катализатора. Анализируемые вещества далеко не всегда способны непосредственно передавать электроны на* электрод (окисляться) или забирать их от него (восстанавливаться), часто это реализуется через посредство промежуточного вещества - переносчика электронов, например, соединений железа. В качестве материала для твердых электродов используют благородные металлы или графит.

Широкое распространение получили три варианта полярографического определения метаболитов, имеющих клиническое значение. Пер-

вый из них основан на учете потребления ***кислорода***, второй - образования ***перекиси водорода***, третий - на использовании в качестве катализаторов ***ферроценов***.

Кислородный электрод - это отрицательно заряженный металлический электрод , на поверхности которого происходит восстановление кислорода воздуха с образованием иона гидроксила OH^- . Выбираются такие условия, при которых сила тока в цепи пропорциональна количеству кислорода воздуха в растворе, т.е. величине его парциального давления. Если нет никаких химических реакций с участием кислорода, его концентрация постоянна, она зависит от высоты местности над уровнем моря и температуры. Однако, если в растворе идет химическая реакция, в которой потребляется кислород, его парциальное давление падает, что и улавливается прибором. Поскольку известно много биохимических ферментативных реакций, в процессе которых потребляется кислород, этот принцип реализован в ряде приборов.

В нашей стране наибольшее распространение получил «Эксан-Г» для быстрого определения глюкозы. В нем фермент глюкозооксидаза иммобилизован на пористой мембране, которая закрывает материал электрода. В окружающий насыщенный кислородом воздуха буферный раствор, объем которого во много раз больше закрытого мембраной участка электрода, вносится исследуемая проба крови. И глюкоза, и кислород диффундируют к мембране, глюкоза окисляется, в результате чего локальная концентрация кислорода в растворе, непосредственно примыкающем к электроду, падает, соответственно уменьшается и сила тока. Преимущество этого метода - дешевизна реактивов, поскольку мембрана с иммобилизованной на электроде глюкозооксидазой служит несколько месяцев, фактически расходуется только недорогой фосфатный буферный раствор.

Похожий принцип реализован и в других анализаторах, позволяющих исследовать целый спектр аналитов - все дело в составе буферной смеси и используемых ферментах. Ферментная система не обязательно должна быть иммобилизованной, она может функционировать и в растворенном виде.

Кислородный электрод также широко используется для определения парциального давления кислорода в биологических жидкостях и тканях, в первую очередь в реанимационной клинике. Чаще всего он входит в состав комбайна для оценки кислотно-щелочного состояния. Так как в крови много веществ, способных участвовать в электродных реакциях, для повышения селективности электрод покрывается тонкой гидрофоб-

ной пластмассовой мембраной, через поры которой могут диффундировать только небольшие нейтральные молекулы кислорода, а более крупные органические молекулы не проходят (рис.42).

Перекись водорода, которая тоже образуется во многих оксидазных реакциях, может быть уловлена полярографически. Методы, основанные на полярографическом измерении ее концентрации, известны, но не нашли такого широкого распространения, как использующие кислородный электрод.

Полярографический метод определения глюкозы с использованием в качестве катализатора ***ферроцена*** - соединения железа с двумя остатками циклопентандиена (это аналог бензола, в кольце которого 5 атомов углерода), реализован в портативных анализаторах гликемии, предназначенных для использования в домашних условиях.. Входящее в состав ферроцена железо окисляется глюкозой в присутствии глюкозооксидазы, а затем восстанавливается на электроде. Не следует путать используемую в этом методе глюкозооксидазу с ферментом, который применяется при химическом определении глюкозы. Это разные ферменты, которые получают из разных

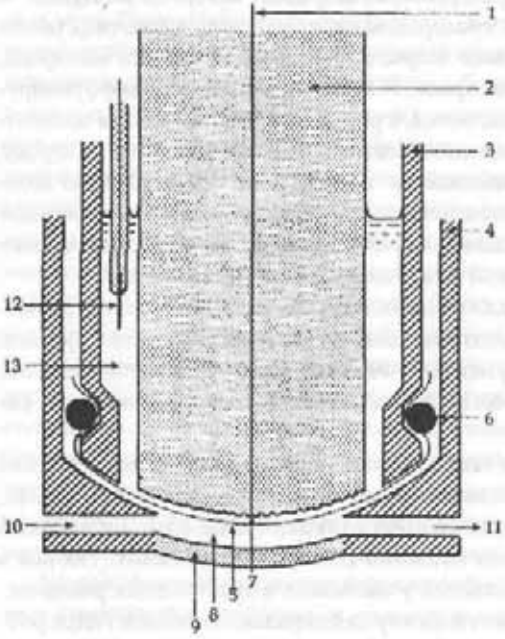


Рис. 42. Схема устройства pO_2 электрода.(По Siggard-Andersen, 1987). **1.** Катод : g = -0,65 V, платиновая проволока. **2.** *Стеклянный резервуар.* **3.** Пластиковый контейнер. **4.**Оболочка электрода. **5.** Проницаемая для кислорода мембрана. **6.** Кислородное кольцо. **7.** Пластиковый катод (открытый конец проволоки). **8.** Кювета. **9.** Стеклянное окно. **10.** Ввод пробы. **11.** Выход пробы. **12.** Анод у= 0 V (Ag/AgCl).**13.** Фосфатный буфер.

источников. Все необходимые инградиенты заранее нанесены на полоску (стрип) разового использования, что очень упрощает работу.

Газовые полярографические электроды используются для определения нейтральных молекул: в первую очередь кислорода, закиси азота, перекиси водорода, окиси серы, а также некоторых металлов.

Потенциометрия: определение pH и ионселективные электроды.

В клинической лабораторной диагностике потенциометрические методы используются широко, хотя и реже, чем фотометрические. Они имеют свои достоинства, но сопряжены с определенными трудностями, преодоление которых требует определенных знаний и понимания сути аналитического процесса. К потенциометрии относятся различные варианты приборов для исследования pH и кислотно-щелочного состояния, а также ионселективные электроды. Электрод для измерения pH по существу является ионоселективным электродом, который обладает специфической чувствительностью к водородным ионам (рис.43, 44а,б). Известно много различных электрохимических устройств, основанных на принципах потенциометрии, объединяемых общим названием «электроды». В клинической лабораторной диагностике наибольшее применение находят pH -метрические и ионоселективные электроды, работа которых рассматривается подробно, другие виды электродов описаны лишь схематично в конце раздела.

Потенциометрические методы основаны на измерении электрического потенциала, который возникает на границе двух сред в том случае, когда ионы одного заряда проникают через эту границу легче, чем противоположно заряженные. Это различие может быть обусловлено свойствами специальной мембраны (перегородки), разделяющей растворы (фазы), или же тем, что ионы одного заряда диффундируют из раствора с большей концентрацией в раствор с меньшей концентрацией быстрее, чем ионы противоположного заряда. В первом случае говорят о мембранном или фазовом потенциале, во втором - о диффузионном. Для аналитических целей измеряют мембранный потенциал, а диффузионные потенциалы обычно являются только помехой, поэтому измерительные электроды или, как их иногда называют, ячейки, конструируют так, чтобы диффузионный потенциал как можно меньше сказывался на результатах измерения.

В *простейшем случае мембрана с избирательной проницаемостью* разделяет два раствора - один известного состава (эталонный) другой исследуемый, однако существует много конструкций электродов в кото-

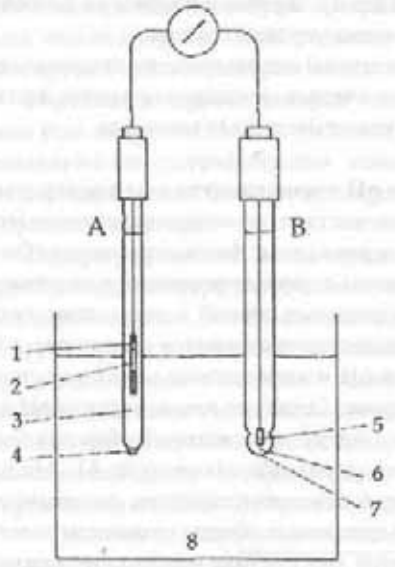


Рис. 43. Схема электрохимической ячейки (По Siggard-Andersen, 1987). **А.** Каломельный электрод (референтный). **В.** Индикаторный (измерительный) электрод. **1.** Ртуть. **2.** Hg_2Cl_2. **3.** Насыщенный раствор KCl. **4.** Жидкое сочленение. **5.** Ag/AgCl. **6.** Референтный раствор. **7.** Стеклянная ионселективная мембрана. **8.** Исследуемый раствор.

а

б

Рис. 44. а. Электрод для измерения pH («Orion»). **б.** Двухканальное устройство для контроля pH Model 2001 Process pH System («Orion»).

рых эталонного раствора как такового нет, его функцию выполняет специально подобранный состав плотной консистенции, который при контакте с исследуемой жидкостью ведет себя так, как будто это эталонный раствор, отделенный полупроницаемой перегородкой от исследуемого.

Электрическая цепь ионселективного электрода такова. По одну сторону ионоселективной (т.е. избирательно пропускающей определенные виды ионов) мембраны находится эталонный раствор, по другую - исследуемый. Оба раствора посредством солевых мостиков , т.е. трубочек, заполненных раствором соли, обычно хлористым калием, контактируют с металлическими электродами, на границе которых с раствором всегда одна и та же разность электрических потенциалов, иногда такой металический электрод называют полуэлементом. Его материал и состав раствора, в который он погружен, подбираются таким образом, чтобы величина этого потенциала была максимально устойчивой. Изготовляемые промышленностью ионоселективные электроды, как правило, используют в качестве полуэлементов хлорсеребрянные электроды - кусочки серебрянной проволоки, покрытые слоем хлористого серебра. Исправный хлорсеребряный электрод должен быть темного цвета, когда он портится, хлористое серебро осыпается и видна светлая металическая поверхность. Реже, в основном в научных исследованиях, используются каломельные полуэлементы, в которых устойчивый потенциал образуется на границе ртути и ее соли - каломели.

Конструктивно ионоселективные электроды изготовляют так, что эталонный раствор (или заменяющая его масса) вместе с мембраной объединены в один блок с металлическим электродом (полуэлементом), к которому подведен электрический провод, вторая же половина электрической цепи также изготовляется в виде отдельного блока, который называется электродом сравнения или референтным. На рис. 45 приведена в качестве примера схема устройства электрода для определения CO_2. Часто несколько ионоселективных электродов - например, для определения натрия, калия и хлора- объединяют в один агрегат. В этом случае достаточно одного, общего для всех ионоселективных электродов, электрода сравнения.

На границе растворов электролитов разных концентраций, разделенных перегородкой с избирательной проницаемостью, ионы из более концентрированного раствора диффундируют в менее концентрированный, но через полупроницаемую перегородку могут проходить ионы только одного заряда, в данном случае, положительного. Поэтому на границе

раздела возникает разность потенциалов - положительные ионы прошли через нее, отрицательные остались в более концентрированном растворе, разбавленный раствор приобретает положительный заряд, концентрированный - отрицательный. Эта разность потенциалов препятствует диффузии новых порций ионов, таким образом разность концентраций способствует перемещению ионов, а разность электрических потенциалов препятствует этому. По законам термодинамики именно работа, которая может быть получена, если процесс идет в одну сторону, или затрачена для того, чтобы он пошел в другую, определяет состояние равновесия. В данном случае, разность электрических потенциалов ус-

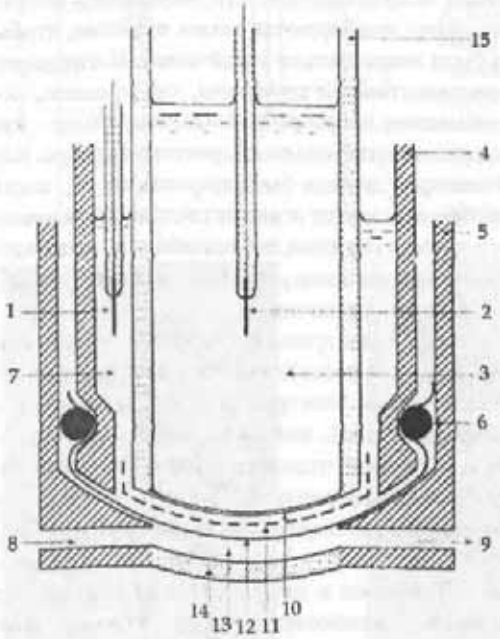


Рис.45. Схема устройства электрода pCO_2.

1. Референтный электрод (Ag/AgCl). **2.** Внутренний электрод (Ag/AgCl). **3.** Фосфатный буфер. **4.** Пластик. **5.** Оболочка электрода. **6.** Кислородное кольцо.**7.** Бикарбонат натрия. **8.** Ввод пробы. **9.** Выход пробы. **10.** pH-чувствительная стеклянная мембрана. **11.** Пористая оболочка. **12.** Проницаемая для CO_2 мембрана (силиконовая резина) **13.** Кювета. **14.** Стеклянное окно. **15.** Стеклянная капсула электрода.

танавливается на таком уровне, чтобы работа, необходимая для того, чтобы перенести небольшие количество положительных ионов против этой разности потенциалов, была равна той работе, которая выигрывается в результате разбавления раствора.

Работа, необходимая для того, чтобы перенести электрические заряды, измеряется просто - она равна электрическому заряду иона, помноженному на разность потенциалов и на абсолютную величину электрического заряда 1 моля ионов - так называемую постоянную Фарадея:

работа против электрического потенциала = $V * z * F$

где V - разность электрических потенциалов (в вольтах),

z - заряд иона (очевидно, что работа, необходимая для того, чтобы перенести 1 моль двузарядных ионов в два раза больше той, которая нужна, чтобы перенести такое же количество однозарядных),

F - постоянная Фарадея 96 485 Кл/моль (Кулон/моль).

Осмотическая работа, которая может быть получена в результате разбавления раствора - перехода от более высокой концентрации к более низкой - оценивается не так просто. Принимается, что она равна той работе, которую выполнил бы газ, если бы он расширялся в цилиндре, поднимая поршень, при чем исходное давление было бы равно тому, которое создается, если количество молекул газа в единице объема равно количеству молекул электролита в концентрированном растворе, а конечное - в разбавленном растворе. Эта работа определяется логарифмом отношения концентраций

работа под влиянием осмотических сил = $\lg(C_1/C_2)*R*T$ + постоянная

где C_1 и C_2 концентрации эталонного и исследуемого растворов,

R - газовая постоянная (константа), 8,3144 Дж K^{-1} $моль^{-1}$,

T - абсолютная температура K (один Кельвин соответствует температуре в градусах по Цельсию + 273,16).

Приравнивая обе величины, получаем выражение, известное как формула Нернста:

$$E = \text{постоянная} + \ln 10 \frac{RT}{zF} \lg (C_1/C_2);$$

после перехода от натуральных логарифмов к десятичным, подстановки значений констант для температуры 25 °C:

$$E = Eo + \frac{59,2}{z} \lg (C_1/C_2)$$

Эта формула связывает величину электрического потенциала в милливольтах с концентрациями электролита. Здесь, как это принято, ln означает натуральный логарифм, lg десятичный. Чтобы определить E_0, ставят эксперимент, в котором обе концентрации равны: $C_1 = C_2$, тогда $C_1/C_2 = 1$, а $\lg(1)=0$, поэтому $E_0 = E$.

Из этой формулы следует, что изменение концентрации ионов в одинаковое количество раз вызывает одинаковое изменение электрического потенциала, *независимо от того, какой ион и в каком диапазоне концентраций* исследуется, имеет значение только заряд иона. Так изменение концентрации натрия со 150 до 165 ммоль/л, т.е. на 10% вызывает такое же изменение электрического потенциала, как изменение калия от 5,0 до 5,5 ммоль/л, хотя в первом случае концентрация возрастает на 15 ммоль/л, а во втором всего на 0,5 ммоль/л. В этом принципиальное преимущество потенциометрических методов по сравнению, например, с фотометрическими - точность определения всегда пропорциональна концентрации, она не зависит от диапазона - идет ли речь о нормальных или патологических величинах.

Из формулы Нернста следует, что электрический потенциал (который собственно и измеряется) всегда пропорционален логарифму концентрации, эти величины для всех ионов связывает один и тот же коэффициент, величина которого зависит только от температуры. Казалось бы, это дает основание считать потенциометрические методы абсолютными, не требующими калибровки. Однако, к сожалению, это не так.

Дело в том, что ионселективный электрод измеряет не общую концентрацию вещества, а так называемую активность иона, которая, хотя обычно пропорциональна общему содержанию, но зависит от многих факторов. Прежде всего часть ионов может быть связана какой-либо компонентой биологической среды, другими ионами или белком. На активность влияют присутствующие в растворе другие ионы - так называемая ионная сила раствора, которую можно оценить по формуле:

ионная сила раствора $J = 1/2\ S\ m z^2$

где m - массовая концентрация иона, а z - его заряд, S - означает, что суммируются значения для всех присутствующих в растворе ионов. В третьих измеряется не общее содержание в единице объема, а концентрация в свободной воде, пространство физически занятое другими молекулами, в первую очередь большими молекулами белка, а также липопротеинами, исключается из расчета. В условиях патологии, при гиперпротеинемии или, особенно, при гиперлипидемии, их влиянием нельзя пренебрегать. Так, массовая концентрация воды сыворотки крови у здоро-

вых людей обычно около 0,93 кг/л, но в некоторых случаях может падать и до 0,80 кг/л. Поэтому активность иона в биологической среде никогда не равна его концентрации, причем коэффициент активности - отношение активности к концентрации - несколько варьирует.

Другая причина, заставляющая использовать калибровки, носит скорее психологический характер. Долгое время основным методом определения калия, натрия и других электролитов была фотометрия пламени, она, так же, как и более совершенный метод атомной абсорбции, до сих пор не потеряла своего значения и, видимо, долго еще будет использоваться в качестве референтного метода. И фотометрия пламени, и атомная абсорбциометрия по своей природе измеряют абсолютное содержание исследуемого элемента в определенном объеме пробы. Эта величина всегда отличается от активности, которая измеряется ионселективными электродами. Чтобы не осложнять работу врача и не заставлять его каждый раз концентрировать внимание на том, использовался ли метод фотометрии пламени или ионометрический, было принято решение калибровать ионометры (приборы, которые читают данные ионселективных электродов) так, чтобы измерялась активность, а на шкале выдавались значения концентраций. Такая калибровка возможна только при совершено определенных условиях - величине pH, концентрациях других ионов, содержании белка, не говоря уже о температуре. Изменение любого из этих параметров приводит к ошибке вследствие нарушения калибровки. Насколько эта ошибка велика и в каких случаях можно ей пренебречь - решает лабораторный специалист.

Согласно рекомендациям Международной федерации клинической химии и лабораторной медицины (МФКХ, IFCC) в калибровочном растворе содержание воды должно быть 0.93±0.005 кг/л, pH 7.40±0.05, концентрации альбумина, общего белка, холестерина и триглицеридов в пределах референтных величин. Результаты выдаются в единицах концентрации вещества (substance concentration) моль/л в расчете на 1 литр «стандартной плазмы» или на воду, содержащуюся в плазме. В первом случае величины ниже, они получаются путем умножения концентрации в воде плазмы на 0,93.

Документ МФКХ предлагает в повседневной работе для калибровок использовать вторичные стандарты, изготовляемые в промышленных условиях на основании первичных стандартов. Документ подчеркивает, что их использование позволяет получать хорошо воспроизводимые (highly precise), но не обязательно правильные (accurate) результаты.

Для практической лаборатории это означает, что выдавая результаты клиницисту, надо полагаться на данные калибровки электрода, которая проводится по промышленно изготовляемым калибровочным растворам. Приобретая калибровочный раствор (или комплект электродов, или ионометр, снабженные калибровочными растворами), следует выяснить, какие концентрации указаны в паспорте: в плазме или же в воде плазмы, поскольку МФКХ допускает и тот, и другой способ выражения результатов.

Существует много разных типов ионселективных электродов. Различают кристаллические и некристаллические электроды. Кристаллические электроды могут быть гомогенные и гетерогенные, в первом случае мембрана изготовлена из кристаллического материала, в ее составе может быть одно вещество или гомогенная смесь нескольких соединений. В случае гетерогенного кристаллического электрода активная субстанция (т.е. кристаллы того вещества, которое обеспечивает избирательную проницаемость) перемешана с инертным носителем, в качестве которого может служить силиконовая резина или поливинилхлорид (ПВХ), формирующие мембрану. Мембрана кристаллического электрода обычно непосредственно прилегает к электрическому контакту, без полуэлемента.

В некристаллических электродах мембрана состоит из основы, содержащей тот или иной вид ионообменника, обычно она разделяет два водных раствора. Мембрана может быть пористой (например, изготовленной из эфиров целлюлозы) или непористой - стеклянной или из нейтрального носителя - поливинилхлорида (ПВХ).

Стеклянные электроды - это ионселективные электроды,в которых чувствительным элементом является перегородка, изготовленная из специального сорта стекла, состав которого определяет свойства электрода. Сюда относятся электроды для определения pH (чувствительные к концентрации водородных ионов) и некоторых одновалентных катионов.

Другой тип некристаллических ионселективных электродов изготовляется на основе подвижных переносчиков, в качестве которых выступают четыре группы веществ. Соответственно различают четыре варианта электродов:

1) на основе гидрофобных положительно заряженных катионов - солей четвертичного аммония или же комплексообразователей, например, производных 1,10-фенантролина. Их растворы в подходящих растворителях, удерживаемые на подложках из эфиров целлюлозы или ПВХ, образуют мембраны, специфически чувствительные к изменениям активности анионов.

2) на основе отрицательно заряженных гидрофобных анионов типа $(RO)_4PO_2$) или больших анионов (например, четвертичного(*n*-хлорфенилбората), растворы которых в соответствующих растворителях на подложках *из инертного материала специфически чувствительны к изменениям* концентраций катионов.

3) на основе незаряженных комплексообразующих переносчиков (антибиотиков, макроциклических соединений и др.), которые позволяют создавать мембраны, избирательно чувствительные к некоторым катионам.

4) на основе хелатных комплексов.

Как видно, промышленность предлагает потребителям широкий выбор ионселективных электродов, основанных на разных механизмах, и практическому работнику трудно оценить преимущества и недостатки каждого из них. Кроме того, фирма, выпуская в продажу ионометр или ионоселективный электрод, входящий в состав биохимического анализатора, может не информировать потребителя не только о деталях конструкции , но даже о принципе работы. Изготовление ионоселективного электрода или ремонт его вне пределов, предусмотренных заводской инструкцией, в клинико-диагностической лаборатории практически невозможен. Лабораторный специалист должен ясно представлять себе, что все электроды нуждаются в постоянной и систематической калибровке, срок работы каждого из них ограничен, электроды, как правило, очень чувствительны к попаданию посторонних веществ - щелочей, кислот, дезинфицирующих агентов, а также к нагреванию. Промывка растворами, не предусмотренными фирменной инструкцией, чревата разрушением устройства.

Теоретическая чувствительность ионселективного электрода для однозарядных ионов при температуре 37° С составляет 61,5 мВ при из*менении концентрации иона в 10 раз. Для двузарядных ионов* теоретическая чувствительность в два раза ниже, это значит, что при таком же изменении концентрации ионов изменение разности потенциала всего 30,75 мВ. Теоретическую чувствительность обычно не удается достигнуть, относительная чувствительность S - это доля теоретической, которую удается получить в реальном устройстве. Для большинства pH-метрических стеклянных электродов величина S очень высокая , порядка 0,98-1,0, для ионоселективных ионов она ниже - обычно около 0,9. Со временем электрод, выходя из строя, теряет чувствительность, поэтому калибровку обязательно ежедневно проводить по крайней мере по двум точкам.

Самые различные вещества, даже в небольших количествах, способны вывести электрод из строя, особую опасность представляют поверхностно-активные вещества, которые могут попасть в пробы, если используется недостаточно отмытая посуда. Белковые молекулы, адсорбируясь на поверхности эдектродов, могут быть причиной неверных показаний, их удаляют многократным промыванием или разрушая протеолитическими ферментами (пепсином). Для оценки качества электрода используются такие понятия: время ответа, дрейф, память электрода (т.е. влияние предыдущих измерений на последующие), коэффициент избирательности , отражающий влияние других ионов (обязательно должно быть указано каких). Чем коэффициент избирательности меньше, тем электрод более специфичен. Избирательность редко бывает абсолютной, обычно, если электрод чувствителен к одному какому-либо виду ионов, обязательно есть химически близкие вещества, которые также сказываются на результатах, и практически важно представлять себе, могут ли эти вещества присутствовать в исследуемом биологическом материале.

Воспроизводимость потенциометрических исследований определяется точностью измерения электрического потенциала, в хороших приборах она около 50 мкВ, т.е. для одновалентных ионов около 0,2% измеряемой величины, для двувалентных ионов, как это следует из приведенной выше формулы Нернста, она в два раза выше.

Правильность зависит от двух причин: 1) неопределенности функционирования электролитного мостика, соединяющего рабочий электрод с электродом сравнения , в котором могут возникать диффузионные потенциалы порядка 0.5 мВ и 2) неадекватности калибровки, о чем уже было сказано выше. Для практических целей можно принять. что при соблюдении всех правил работы правильность для одновалентных ионов составляет около 2% от измеряемой величины.

Специальные электроды

Известен целый ряд специальных электродов, которые в клинической лабораторной диагностике используются только как вспомогательные устройства, однако их роль в научных исследованиях очень велика. Ниже приводится их краткое описание, в котором затронуты, главным образом, те стороны их работы, с которыми при определенных обстоятельствах приходится сталкиваться лабораторным специалистам.

Окислительно-восстановительный или redox -потенциал и, соответственно, редокс - электрод, можно представть как специальный слу-

чай ионоселективного электрода, когда через мембрану переносится не ион, а электрон. Функцию мембраны в данном случае выполняет целая система, состоящая по меньшей мере из двух электродов. В академическом плане исследование окислительно-восстановительных потенциалов очень важная проблема, однако, в современной клинической лаборатории их применение ограничено, главным образом в качестве составных элементов субстрат-специфических электродов.

Когда в растворе присутствуют вещества, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях, например, ионы двух- и трехвалентного железа, а также электрод, с которым они могут обмениваться электроном, электрод приобретает электрический заряд. Такие ситуации называются обратимыми или равновесными электродными окислительно-восстановительными реакциями. Пойдет реакция как равновесная или неравновесная, зависит не только от природы реагирующих веществ, но и от электрода, материал которого часто выполняет функцию гетерогенного катализатора. Обычно используют электроды из благородных металлов -золота, платины, палладия. Величина потенциала зависит от того, каких молекул больше - тех, у которых больше электронов и которые готовы их отдать (т.е. восстановленной формы) или же тех, у которых их меньше и которые поэтому готовы их принять (т.е. окисленной формы). Если электродов два, они электрически соединены и каждый опущен в раствор, где идут окислительно-восстановительные реакции, причем в первом преобладает восстановленная форма вещества, а во втором - окисленная, то восстановленная форма будет передавать электроны на электрод, тем самым окисляясь, а окисленная забирать их с другого электрода, тем самым восстанавливаясь. Между электродами возникнет электрической ток. Чтобы остановить его, наобходимо приложить электрический потенциал, аналогично тому, как это было при движении ионов в ионселективном электроде. В таких случаях говорят, что возникает разность электрических потенциалов, которая описывается той же формулой Нернста:

$$E = \text{постоянная} - \ln 10 \frac{RT}{zF} \lg(Red/Ox) = Eo - \frac{59{,}2\ \text{мВ}}{z} \lg(Red/Ox)$$

здесь z - число электронов, которое участвует в реакции, чаще всего это один, Red и Ox это концентрации окисленной и восстановленной форм, Eo - константа, характеризующая химическую реакцию, ее так называемый стандартный потенциал. Очевидно, что если количества

окисленной и восстановленной форм равны, то Red/Ox =1, а lg(Red/Ox)=0. В этом случае окислительно-восстановительный потенциал системы равен своему стандартному значению.

Исследуемые в клинических лабораториях аналиты, как правило, не могут непосредственно окисляться или восстанавливаться на электродах, т.е. не могут непосредственно обмениваться с ним электронами. В этих случаях говорят, что они не образуют равновесной системы, в некоторых случаях этого можно добиться, используя катализаторы - промежуточные переносчики электронов.

Известно несколько аналитических систем, где окислительно-восстановительные потенциалы лежат в основе субстратного электрода, однако распространение получили только электроды для определения молочной кислоты (лактата), но и они не пошли в широкую практику. Одно время увлекались измерением окислительно-восстановительных потенциалов крови и других биологических сред - но оказалось что этот показатель неустойчив (видимо, потому что система не всегда оказывается равновесной) и малоинформативен.

Особое место занимают ***электроды сравнения - хлорсеребряный и каломельный***, их называют также полуэлементами, так как в реальных измерительных системах они выполняют только вспомогательную функцию.

При потенциометрии цель состоит в измерении электродвижущей силы (потенциала) на рабочем pH-метрическом или ионоселективном электроде, при полярографии - в измерении силы тока, также на рабочем электроде, и в том и в другом случае нужен второй электрод, чтобы образовать замкнутую электрическую цепь. Главное требование ко второму электроду (его называют электродом сравнения или индифферентным электродом) - стабильность работы.

Каломельный электрод представляет собой жидкую металлическую ртуть, в которую опущен электрический контакт. Над ртутью находится слой плохорастворимой одновалентной хлористой ртути - каломели Hg_2Cl_2, который образует насыщенный раствор. Когда электрод имеет отрицательный заряд, электроны переходят в раствор, ионы ртути становятся атомами, когда он заряжен положительно, наоборот атомы ртути теряют электроны, превращаясь в ионы. Процесс этот идет обратимо в том смысле, что все время находится в равновесии. Если нет внешнего электрического напряжения, разность потенциалов между электродом и раствором зависит только от концентрации ионов ртути в растворе. Каломель плохо раство-

рима, поэтому концентрация ионов в растворе мала, она зависит от концентрации ионов хлора. Обычно используют либо насыщенный каломельный электрод, когда раствор над его поверхностью насыщен хлористым калием, либо с концентрацией хлористого калия 1 моль/л.

Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрия является физико-химическим методом исследования веществ, основанным на определении массы и количества ионов вещества. Исследуемое вещество в газообразном состоянии подвергается ионизации в очень высоком (порядка 10^{-5} - 10^{-7} торр; 1 торр = 1,0 мм рт. ст.) вакууме (рис.46). Ионизация происходит за счет поглощения электронов, химической ионизации, воздействия электронной пушкой . Наиболее крупные, полярные, нелетучие соединения подвергаются процедуре полевой дезорбции (field desorption), которая состоит в сочетанном воздействии высокого напряжения (от 8000 до 10000 вольт) и нагревания. Этот способ дает наиболее четкий и простой спектр основного иона молекулы, поскольку в этих условиях ионы фрагментов молекулы не успевают достигнуть детектора. Образовавшиеся ионы в зависимости от величины отношения их массы к заряду разделяют с помощью электрических и магнитных полей в масс-спектрометре: наиболее легкие ионы отклоняются наиболее далеко, более тяжелые - на меньшее расстояние. Величина сигнала зависит от количества ионов в определенной зоне (рис. 47). При ионизации большинство веществ образует примерно в 100 раз больше положительных инов, чем отрицательных. Поэтому масс-спектрометры большей частью предназначены для детекции положительно заряженных ионов молекул и их фрагментов. Для предотвращения загрязнения, вызванного конденсацией следов предыдущей пробы внутри прибора, часть устройства постоянно нагрета до 200-320 °С. Метод позволяет определять качественный и количественный состав веществ, их молекулярную структуру на основе измерения масс и относительного содержания нераспавшихся и распавшихся после ионизации молекул.

Молекулярная масса может быть измерена этим способом с точностью до десятитысячных единицы атомной массы.. Субмикрограммовые количества неизвестных веществ в твердом, жидком и газообразном состоянии могут быть детально охарактеризованы и подсчитаны с высокой чувствительностью и специфичностью. В клинической аналитике используется для определения ряда эндогенных аналитов, а также ле-

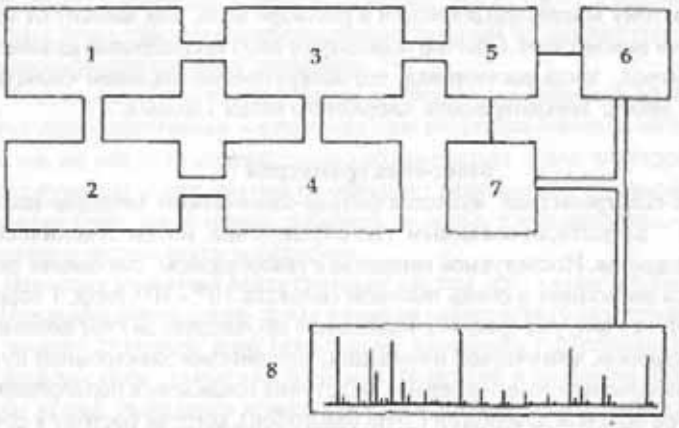


Рис. 46. Схема устройства масс-спектрометра. **1.** Источник ионов. **2.** Ввод пробы. **3.** Фильтр масс. **4.** Вакуумная система. **5.** Детектор. **6.** Самописец. **7.** Компьютер. **8.** Вид спектрограммы.

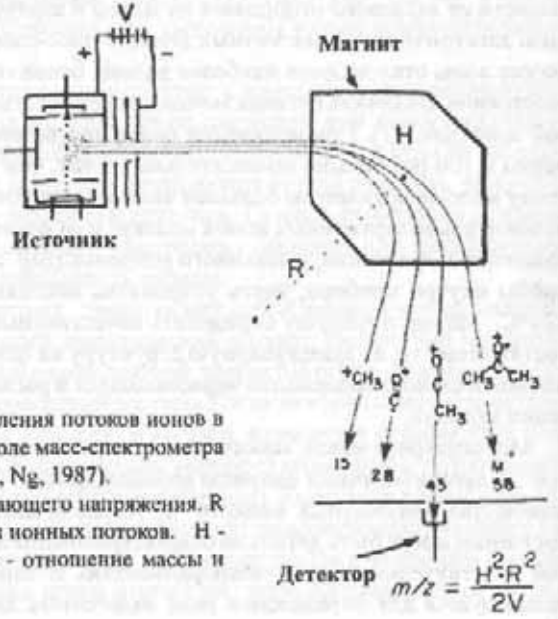


Рис. 47. Схема разделения потоков ионов в сильном магнитном поле масс-спектрометра (По Andresen, Hurtuk, Ng, 1987).
V - Источник возрастающего напряжения. R - Радиусы отклонения ионных потоков. H - Магнитное поле. m/z - отношение массы и заряда иона.

карств и их метаболитов в биологических жидкостях. Обычно масс-спектрометрия используется в качестве одного из способов детекции веществ после их хроматографического разделения в газовом хроматографе.

Радиометрия

В целях измерения количества вещества , в частности , в качестве метки в лигандных методах, лабораторная медицина использует и *явление радиоактивности*.

В основе явления радиоактивности лежит способность ядер некоторых элементов самопроизвольно расщепляться с выбросом элементарных частиц и энергии в форме светового или рентгеновского излучения. Потоки как частиц, так и энергии, могут быть измерены соответствующими приборами (радиометрами).

Свойства химических элементов определяются строением их атомов. Ядро атома состоит из протонов и нейтронов. Число протонов называют атомным числом, число нуклеонов (т. е. суммы протонов и нейтронов) - массовым числом. Нуклид - это атом, характеризуемый атомным и массовым числами. Химическое вещество обозначается химическим символом его названия и атомным числом. Изотопы химических веществ - это нуклиды с одинаковыми атомными числами, но различными массовыми числами.

Большинство элементов представляют собой смесь изотопов. У тяжелых элементов часть изотопов нестабильны, и распадаясь, они выделяют часть своего вещества и энергию в виде излучения. Стабильность ядер и их энергия зависят от отношения числа протонов и нейтронов. Химические свойства изотопов практически одинаковы, так как они зависят преимущественно от числа и расположения орбитальных электронов и лишь в малой степени от атомной массы. Поскольку живые системы не могут различать изотопы, это обстоятельство используют в методах изотопной метки.

Известно несколько вариантов радиоактивного распада.

1. **α-распад** заключается в отщеплении от тяжелых элементов (с атомным числом > 70) 2-3 нейтронов - ядер гелия, называемых α-частицами. Эти изотопы редко используются в клинико-лабораторной практике.

2.**β-распад** состоит в преобразовании ядра без изменения числа нуклеонов и массового числа. Стабильность ядра достигается путем перехода нейтрона в протон или наоборот с выделением электрона или позитрона, т. е. β-частицы. Если этот вид распада происходит с теми ядрами, где нейтронов больше, чем нужно для стабильности: ^{14}C; ^{3}H; ^{131}I; ^{59}Fe, то атом теряет элек-

трон, а ядро приобретает более высокий номер. При избытке протонов ядро захватывает электрон и приобретает более низкое атомное число.

Поскольку освобождается место на нижней орбите, высокоэнергетический электрон может его занять с испусканием рентгеновского излучения.

Высокоэнергетическое **γ-излучение** сопровождает переход ядра из возбужденного в основное состояние. Для каждого радионуклида известны стадии диэкситации и энергии γ-лучей, что позволяет их идентифицировать (табл. 16).

Скорость распада (т. е. перехода радиоактивного атома в атом с меньшей энергией) называют активностью источника радиоактивности. Общепринятой единицей радиоактивности служит кюри (Ci), равная 3,7 x 1010 распадов в секунду или 2,2 x 1012 распадов в минуту, что соответствует приблизительно активности 1 г радия-226. За единицу радиоактивности в международной системе единиц (СИ) принят беккерель (Bq), равный 1 распаду в секунду.

1 мккюри = 37 килобеккерелям. 1 Ci = 3,7 x 1010 Bq.

Термин «специфическая активность» может означать либо радиоактивность на единицу массы элемента, либо радиоактивность на массу меченого соединения, либо радиоактивность на единицу объема раствора.

Таблица 16

Свойства некоторых радионуклидов (по Dillman, 1969; Tietz, 1987)

Нуклид	*Полупериод распада*	*Вид распада*	*Max энергия излучения в MeV*	
			β	*γ*
^{3}H	12,3 г	β-	0,018	
^{14}C	5730 лет	β-	0,156	
^{32}P	14,3 сут	β-	1,71	
^{35}S	87,1 сут	β-	0,167	
^{51}Cr	27,8 сут	Электронный захват	0,32	
^{59}Fe	45 сут	β−, γ-	0,273; 0,475	1,095; 1,292
^{57}Co	270 сут	Электр. захват	0,122; 0,136	
^{58}Co	71,3 сут	Эл. захват; β−; γ-	0,47	0,81; 1,67
99mTc	6 ч	Изомерическое смещение		0,141
^{125}I	60 сут	Электр. захват	0,036	
^{131}I	8,1 сут	β−; γ-	0,61	0,364

Радиоактивное излучение способно вызвать при контакте с другими молекулами и атомами ряд эффектов. При переходе под действием энергии радиоактивного излучения электронов облученного вещества на более высокий энергетический уровень происходит возбуждение этого вещества. Если же эта энергия способна оторвать электрон от молекулы, происходит ионизация вещества, т. е. образование ионов.

Электромагнитное излучение низкой мощности, не вызывающее ионизации, производит тепловой эффект. Фотоны более высокой энергии, равной и превышающей энергию связывания электрона, вызывают фотоэлектрический эффект, т. е. выброс электрона из атома. При значительном превышении энергии связывания электрона несколько ослабленный фотон - γ-лучей рикошетирует, меняя направление, а электрон отрывается от атома в другом направлении (эффект Комптона).

Регистрация и измерение радиоактивности в клинико-химических исследованиях чаще всего осуществляется с помощью флюоресцентной сцинтилляции, т. е. вспышек света, которые возникают в кристаллическом или жидкостном сцинтилляторе под действием адсорбированной энергии радиации. Свет собирается, переводится в электрические импульсы, которые подсчитываются.

Твердокристаллический детектор представляет собой цилиндрический кристалл иодида натрия, в торце или стенке которого образовано отверстие для ввода туда пробирки с пробой (Рис. 48). Поскольку кристалл гигроскопичен, он герметично упакован в оболочку из алюминия, в которой имеется окошко из кварцевого стекла для регистрации сцинтилляции синефиолетового цвета, возникающей под действием γ- и рентгеновского излучения радиоактивного образца, содержащего хром-51, кобальт-57, железо-59, йод-125, йод-131. Приборы с такими детекторами называют гамма-счетчиками. В них регистрируется до 70% происходящих распадов.

Современные гамма-счетчики оснащаются компьютерами для управления процессом подсчета импульсов, что отражено в названии прибора компании Packard COBRA Quantum («COmputer Based RadioAssay System») (рис.49).

В жидкостном сцинтилляционном детекторе свечение возникает в прозрачном сосуде, куда помещают смесь пробы и жидкого сцинтиллятора (Рис.50). Приборы этого типа удобны для регистрации радиоактивности атомов, излучающих β-частицы низкой энергии, в том числе трития (максимум энергии 19 KeV) и углерода-14 (максимум энергии 156 KeV). Эффективность детекции 60% для трития и 90% для углерода-14. Жидкий сцин-

тиллятор представляет собой смесь жидкостей, основу которых составляет ароматический углеводород (толуол, ксилол или 1,2,4-триметил бензол), в котором растворен собственно сцинтиллятор (2,5-дифенилоксазол), поглощающий энергию и испускающий ультрафиолетовое свечение с длиной волны 380 нм. В состав смеси могут входить другие соединения, повышающие растворимость пробы, стабилизирующие смесь, удлиняющие время свечения, предотвращающие замерзание смеси и отделение воды.

Для получения надежных результатов необходимо следить за эффективностью сцинтилляции, т. е. отношением энергии испускаемого света к энергии радиации. Снижение эффективности может быть результатом разрушения кристалла в твердокристаллическом детекторе или плохой подготовки пробы для жидкостного сцинтиллятора. Эффективность сцинтилляции - объект контроля качества исследований, поскольку ее колебания могут вызвать ошибки в результатах измерения. Если прибор автоматически не коррегирует ослабление эффективности, необходимо применять внутренние стандарты.

Распределение числа распадов подчиняется закону Пуассона, при

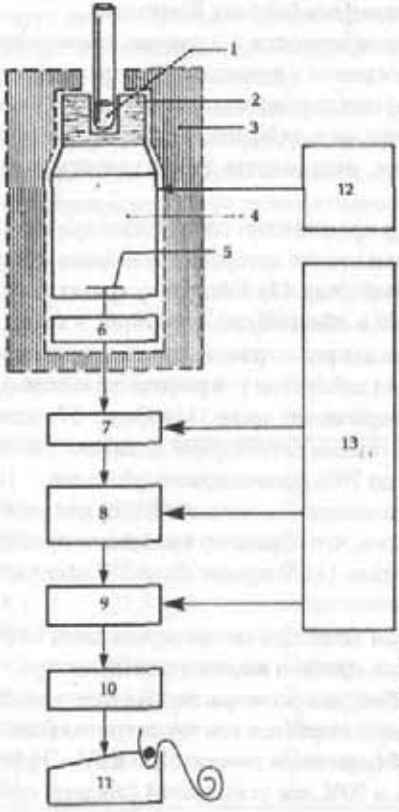


Рис. 48. Схема устройства твердокристаллического сцинтилляционного детектора.
1. Пробирка с исследуемой пробой. **2.** Кристалл иодида натрия. **3.** Свинцовая оболочка. **4.** Трубка фотоумножителя. **5.** Коллектор. **6.** Преамплификатор. **7.** Амплификатор. **8.** Анализатор высоты пульсации. **9.** Шкала. **10.** Компьютер. **11.** Принтер. **12.** Высоковольтный источник электрического тока. **13.** Источник электрического тока.

оценке тысяч распадов оно близко к нормальному распределению. Стандартное отклонение равно квадратному корню из средней ($S = \sqrt{X}$).

При работе на счетчиках радиоактивности следует иметь в виду наличие фоновой радиоактивности, присущей самой лабораторной среде. Из результата подсчета активности пробы фоновая активность должна быть вычтена:

$C_S = C_{S+b} - C_b$; где

C_S - данные подсчета пробы; C_b - данные подсчета фоновой активности; C_{S+b} - данные подсчета суммарной активности.

При оценке ошибки подсчета используется общее правило, в котором фигурируют квадраты стандартных (т. е. среднеквадратичных) отклонений: $S^2_S = S^2_{S+b} + S^2_b$

Рис. 49. Гамма- счетчик COBRA Quantum («Packard», США) оснащен компьютерной системой самоконтроля выполнения исследований.

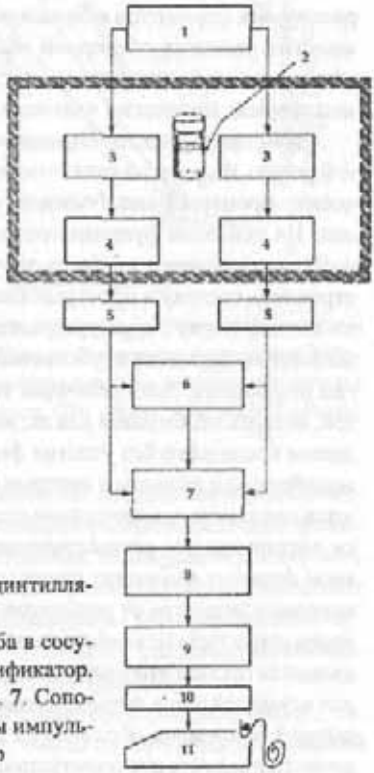


Рис. 50. Схема устройства жидкостного сцинтилляционного детектора.
1. Высоковольтный источник тока. **2**. Проба в сосуде. **3**. Трубка фотоумножителя. **5**. Преамплификатор. **6**. Амплификатор. **6**. Сумматор импульсов. **7**. Сопоставление сигналов. **8**. Анализатор высоты импульсов. **9**. Шкала. **10**. Компьютер. **11**. Принтер

IV. МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ, ОСНОВАННЫЕ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЯХ

Методы с использованием специфических каталитических свойств ферментов

Ферменты как объекты клинических лабораторных исследований

Важная биологическая роль, которую играют ферменты в качестве катализаторов всего многообразия биохимических реакций, составляющих суть процессов жизнедеятельности в организме человека, определила место, занимаемое клинико-лабораторными анализами активности различных ферментов в биожидкостях. Клиническая лабораторная энзимология является обширной областью повседневно выполняемых клиническими лабораториями диагностических исследований при различных формах патологии человека.

Свойства ферментов определяются их белковой природой и биологической ролью. Ферменты являются биологическими катализаторами биохимических процессов метаболизма различных соединений в живых организмах. Их основная функция состоит в связывании расщепляемых соединений с «активными центрами», т.е. участками структуры ферментного белка, строению, составу и пространственной организации которых специфически соответствует структура расщепляемого соединения - субстрата. Взаимодействие фермента с субстратом приводит к некоторому повышению энергии в субстрате. Хотя величина этой энергии активации намного меньше той, которая необходима для активации субстрата и начала реакции превращения последнего без участия фермента, благодаря специфическому взаимодействию с активным центром фермента, в результате которого ослабляются связи между некоторыми атомами в молекуле субстрата, ее оказывается достаточно для осуществления превращения субстрата.(Рис.51) Тем самым фермент позволяет преодолеть энергетический барьер, отделяющий исходные вещества от продуктов реакции и мешающий началу преобразования структуры исходного вещества.. Ферментно-субстратные комплексы являются промежуточными соединениями, имеющими решающее значение для осуществления ферментативного процесса (рис.52) , скорость которого зависит от времени образования этого комплекса, времени образования конечного продукта и концентрации субстрата. С увеличением его концентра-

Рис. 51. Барьер активационной энергии и ход реакций при участии фермента и без него. По оси ординат - энергия. По оси абсцисс - направление реакции. Величина энергии активации для фермент-субстратного комплекса многократно меньше энергии активации для субстрата без фермента. (По Moss, Henderson, Kachmar, 1986)

ции скорость ферментативной реакции возрастает и достигает определенного предела, т. е. не увеличивается при дальнейшем увеличении концентрации субстрата, а может даже падать (субстратное торможение). Скорость катализируемой ферментом реакции с концентрацией субстрата связывает кривая Михаэлиса - Ментена. Константа Михаэлиса - Ментена соответствует концентрации субстрата, при которой достигается половина максимальной скорости его каталитического превращения. (рис.53)

Некоторые ферменты проявляют абсолютную специфичность, т.е. способны катализировать расщепление только одного вида соединений

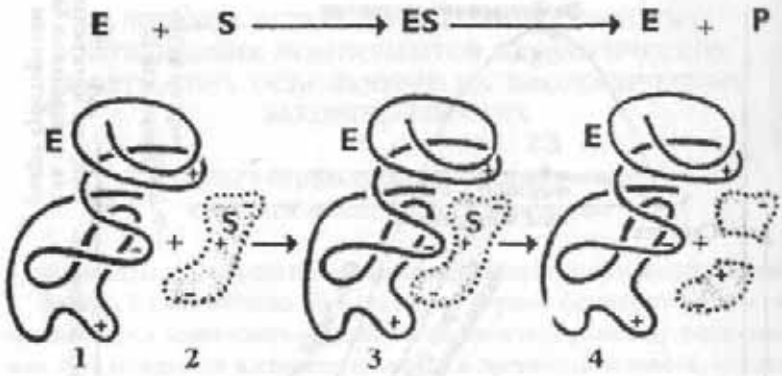


Рис. 52. Механизм действия фермента: 1. Фермент. 2. Субстрат. 3. Фермент-субстратный активный комплекс. 4. Продукт реакции.

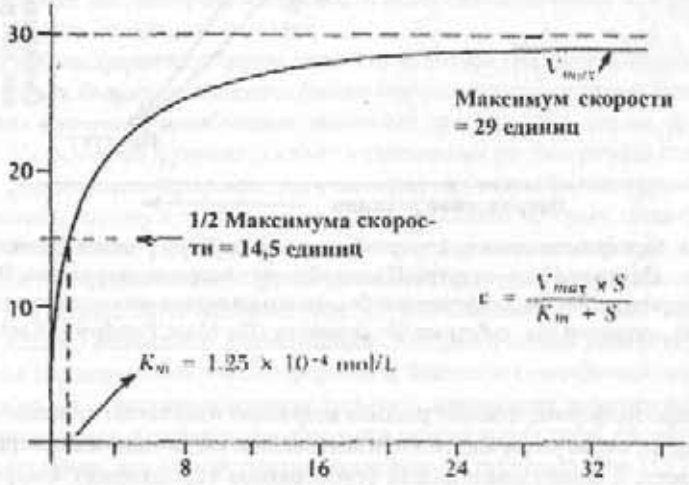


Рис. 53. Кривая Михаэлиса-Ментена, характеризующая отношение скорости катализируемой ферментом реакции к концентрации субстрата. По оси ординат - скорость реакции в произвольных единицах, по оси абсцисс - концентрация субстрата в молях на литр x 10^{-4}. Величина K_m соответствует концентрации субстрата, при которой достигается максимальная скорость реакции. (По Moss, Henderson, Kachmar, 1986)

(например, пируваткиназа способствует переносу фосфатной группы между фосфоэнолпируватом и АДФ и не проявляет никакой иной каталитической активности). Другие ферменты проявляют меньшую степень специфичности. Так, например, гексокиназа способна переносить фосфатную группу от АТФ не только на D-глюкозу, но и с той же скоростью на D- фруктозу, D- маннозу, 2-дезокси- D- глюкозу. Однако, этот фермент не проявляет аналогичной каталитической активности в отношении D- галактозы и других гексоз и пентоз, хотя некоторые из них могут связываться с ним и тормозить его активность. Ряд ферментов проявляет групповую специфичность, т.е. способны катализировать аналогичное превращение в отношении ряда близких по строению соединений. Многие ферменты проявляют стереоспецифичность, т.е. способность катализировать превращения лишь определенных стереоизомеров (например, D-изоформ глюкозы, но не L-изоформ).

В основе большинства применяемых в клинической лабораторной практике методов исследования активности ферментов в биоматериалах человека лежит использование их каталитических свойств в отношении определенных специфических субстратов, которые, подвергаясь превращению под действием ферментов, используются для измерения их каталитической активности. Субстраты бывают природного происхождения и синтетические, используемые наиболее широко. Выбор субстрата очень важен, так как они гидролизуются с различной скоростью. Скорость гидролиза синтетического субстрата обычно на один или более порядков выше, чем натурального субстрата; например, бета-галактозидаза гидролизует синтетический субстрат 2-нитрофенил-β-d-галактозид в 7 раз быстрее, а 4-нитрофенил-β-d-галактозидид в 17 раз быстрее, чем натуральный субстрат лактозу. Однако скорость реакции с использованием синтетического субстрата может быть и ниже, чем с использованием натурального.

Выбор синтетических субстратов ограничен их растворимостью. Например, субстрат для гамма-ГТ - L-γ-глутамил-р-нитроанилид может существовать в растворе до концентрации 4 моль/л, в то время как оптимум концентрации субстрата для реакции составляет 5,5 моль/л при 25°С. Оптимум концентрации зависит от t° и pH.

К синтетическим субстратам относятся так называемые «хромогенные субстраты», которые под действием ферментов гидролизуются с образованием окрашенных соединений. Наиболее известная хромогенная группа - *пара-нитроанилин и пара-нитрофенол*. Хромогенные субстраты применя-

ются в методах определения α-амилазы (4-нитрофенил-мальтогептозид), щелочной и кислой фосфатаз (4-нитрофенилфосфат), гамма-глутамилтрансферазы (γ–глутамил-4-нитронилид и -gглутамил-3-карбокси-4-нитроанилид), а также в методах определения тромбина, факторов II, V, VII, VIII, IX, X, плазминогена, антитромбина III, трипсина, гепарина и др.

Скорость ферментативных реакций в высокой степени зависит от pH и от температуры среды.

Величина pH влияет на связывание субстрата с ферментом и на скорость распада фермент-субстратного соединения. Многие ферменты проявляют максимальную активность при величине pH, свойственной плазме крови в условиях нормы, т.е. 7 - 8. Однако, некоторые из них активны и при низких значениях pH (пепсин при величине pH порядка 1,5), а другие при очень высоких значениях активности водородных ионов (щелочная фосфатаза - при pH 10,5). (Рис. 54) Роль величины pH для деятельности ферментов многообразна: с одной стороны, величина pH влияет на степень диссоциации субстрата, что важно для взаимодействия его с активным центром фермента, а с другой - на степень диссоциации аминокислотных цепей в молекуле фермента, что, в свою очередь, может изменить его каталитическую активность, вплоть до необратимой инактивации при резком отклонении pH от оптимальной зоны. Поэтому при выполнении ферментных исследований очень важно использовать адекватные буферные растворы для постоянного сохранения pH реакционной среды в зоне оптимума для изучаемого фермента.

Как и на всякую химическую реакцию, на скорость ферментативной реакции существенное влияние оказывает температура. В связи с этим общим положением было выдвинуто представление о «температурном оптимуме» для активности ферментов. (Рис.55) При этом должны приниматься во внимание как длительность периода инкубации при избранной температуре, так и стабильность фермента в этих условиях. Нормально функционирующему человеческому организму присущ температурный диапазон 36 -37 °С. Для исследования ферментов во многих методах также предлагаются эти температурные условия. При этом достаточно высока чувствительность метода и относительно быстро производится измерение. Однако, в этих условиях инактивация фермента также происходит быстрее, поэтому экспертной группой по ферментам Международной Федерации клинической химии было предложено в качестве стандартного условия выполнения референтных методов исследования ферментов использовать температуру 30 °С. В некоторых странах эти ус-

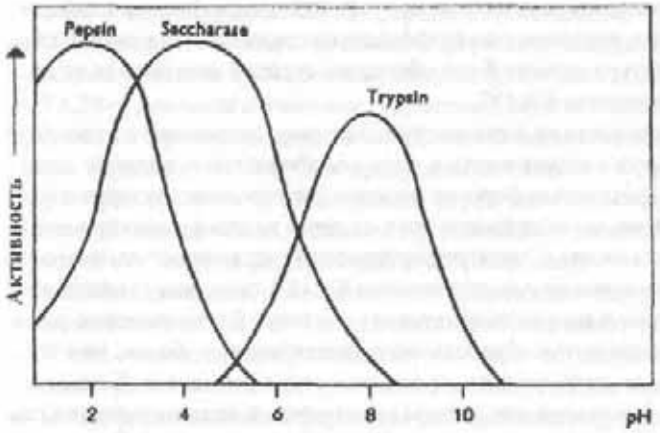


Рис.54. Оптимумы pH для различных ферментов.
По оси ординат - активность ферментов. По оси абсцисс - значения pH

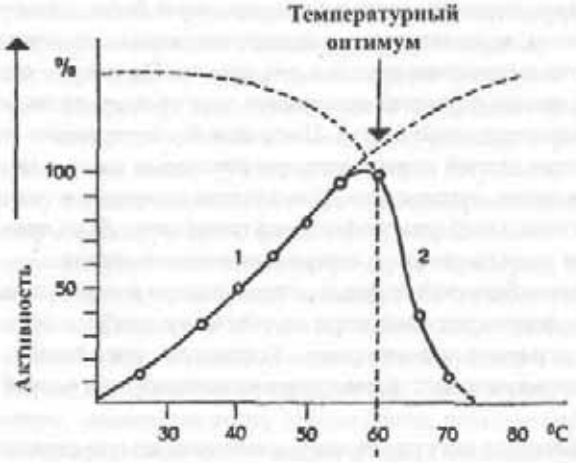


Рис.55. Температурный оптимум фермента.
По оси ординат - активность фермента (в %). По оси абсцисс - температура (в градусах по Цельсию).

ловия были избраны и для рутинных методов исследования ферментов. Для сопоставления результатов, полученных при различных температурных условиях, предлагаются коэффициенты перевода. При любой избранной температуре должен быть обеспечен строгий контроль за ее постоянством в пределах ± 0,1°С.

При исследовании активности некоторых ферментов в биологических жидкостях следует иметь в виду особенности поведения изоферментов, т.е. различных форм их молекул , которые катализируют одну и ту же реакцию, но отличаются друг от друга рядом физико-химических свойств (активностью, электрофоретической подвижностью, иммунобиологическими реакциями, величинами Km1), а также могут незначительно отличаться и по аминокислотному составу. Возникновение различных форм ферментов обусловлено существованием более, чем одного локуса в генах, кодирующих строение молекул ферментов. В отношении некоторых ферментов эти локусы размещаются даже на разных хромосомах.Другим источником многообразия форм ферментов является их олигомерная структура, т.е. наличие в строении их молекул нескольких субъединиц (протомеров). Различные комбинации этих субъединиц приводят к формированию т. наз. гибридных изоэнзимов.

К ферментам, существующим в виде различных форм, относятся малатдегидрогеназа, креатинкиназа, лактатдегидрогеназа, щелочная фосфатаза, аспартатаминотрансфераза и ряд других. По своему строению изоферменты одного фермента отличаются друг от друга разными соотношениями полипептидных цепей. Процентные соотношения изоферментов в клетках тканей изменяются при некоторых заболеваниях, что используют в целях диагностики. Для анализа изоэнзимов чаще всего используется зональный электрофорез, но также могут быть применены ионообменная хроматография и иммунохимические методы.

Соединения небелковой природы, в присутствии которых проявляется активность ферментов благодаря их участию в конформации активного центра, называют *кофакторами*. Кофакторы, как правило, термостабильны, связывание их с ферментами характеризуется разной степенью сродства.

В роли кофакторов могут выступать ионы металлов или сложные органические вещества - коферменты. Среди ионов металлов кофакторами служат Zn^{2+} (алкогольдегидрогеназа, карбоксипептидаза), Mg^{2+} (фосфогидролазы, фосфотрансферазы), $Fe2^{+}$ или Fe^{3+} (цитохромы, пероксидаза, каталаза), Mn^{2+} (аргиназа, фосфотрансферазы), Cu^{2+} или Cu^{+} (цитохро-

моксидаза), K^+ (пируватфосфокиназа), Na^+ (АТФ-аза). Коферменты - органические соединения небелковой природы с относительно низким молекулярным весом по сравнению с белком фермента. Коферменты выполняют специфические функции, как, например, перенос водорода (НАД или НАДФ в реакциях с участием гидрогеназ), перенос ацильных групп (кофермент А в реакциях синтеза и разложения жирных кислот), изомеризация (уридиндифосфат при превращении глюкозы в галактозу). К коферментам различного химического строения относятся глутатион, производные пиридоксина, витамина B_1, фолиевой кислоты, биотин, нуклеотиды и нуклеозиды (НАД, НАДН, АТФ, КоА) и др.

Вещества, повышающие активность ферментов или переводящие ферменты в активное состояние из неактивного, называют *активаторами*. К ним относятся минеральные соли и кислоты (например, HCl для пепсина), органические вещества (желчные кислоты для панкреатической липазы), специальные ферменты (энтерокиназа при превращении трипсиногена в трипсин), а также катионы и анионы минеральных солей. Иногда активация фермента обеспечивается не одним, а несколькими ионами. Одни и те же ионы в различных концентрациях могут являться активаторами и ингибиторами для одних и тех же ферментов, а также для различных ферментов (например, Zn активирует глицилдейцинпептидазу, но тормозит активность креатинкиназы).

Вещества, подавляющие активность ферментов, носят название *ингибиторов*. Например, иодуксусная кислота тормозит ферментативные реакции углеводного обмена. По механизму реакции с ферментами ингибиторы делятся на две группы: ингибиторы, вступающие с ферментом в обратимую реакцию (конкурентное и неконкурентное торможение), и ингибиторы, реагирующие с ферментом необратимо.

К первой группе относятся, например, азид натрия, ионы тяжелых металлов, фторид натрия, дикарбоновые кислоты, ко второй - фосфорорганические соединения (в частности, инсектициды). Концентрация природных ингибиторов в тканях и плазме незначительна и заметно не влияет на определение активности ферментов. Лишь в моче были найдены ингибиторы, мешающие этому определению, поэтому перед ферментативным определением мочу следует подвергать диализу. Известными ингибиторами являются фосфат для фосфатазы, аскорбиновая и мочевая кислоты для пероксидаз.

При определении ферментов возможно внесение ингибиторов - остатков детергентов, используемых для мытья стеклянной посуды, и ин-

гибиторов, образующихся спонтанно в растворах НАДН и НАДФН. Поэтому растворы этих коферментов должны быть всегда свежеприготовленными. Лекарственные препараты и их комбинации влияют на активность ферментов в плазме или сыворотке крови, возможность такого влияния необходимо учитывать.

Все изложенное выше относится к методам определения каталитической активности ферментов и позволяет оценить многообразные трудности, возникающие в процессе выполнения этих аналитических процедур. Гораздо легче было бы стандартизовать этот вид исследований, если бы шла речь об определении массы фермента. Однако условием перехода к такому варианту исследований ферментов является знание их молекулярной активности, то-есть количества преобразованных молекул субстрата в секунду в расчете на моль фермента. Понятно, что для таких расчетов необходимо знать молярность ферментов, а это требует высокой степени их очистки. Обходным путем служит количественное определение некоторых веществ, способных специфически связываться с активными центрами ферментов, например, меченого радиоактивным изотопом фосфата, необратимо связавшегося с активными центрами щелочной фосфатазы в кислой среде. Тем самым может быть определена концентрация активных центров фермента в растворе, а отсюда и концентрация молекул фермента. Количество вещества фермента, выраженное в молях, является частным от деления каталитической скорости реакции (в молях трансформированного субстрата за секунду) на молекулярную активность (количество молей трансформированного субстрата за секунду на моль фермента).

Другой подход состоит в применении различных иммунологических методов для определения фермента как специфического белка.

Наиболее широкое применение определение массовой концентрации фермента получило для исследования МВ фракции креатинкиназы при диагностике инфаркта миокарда.

Ферменты как аналитические реагенты

Поскольку фермент не участвует в реакции превращения субстрата в метаболит, а лишь способствует ей, катализируя процесс, сама структура фермента не подвергается изменениям и способна многократно совершать каталитическое воздействие. При этом сам фермент может присутствовать в реакционной среде лишь в незначительном количестве. Специфичность действия,высокая активность в минимальных количе-

ствах вещества, способность многократного участия в реакции, отсутствие токсичности делает ферменты весьма привлекательным видом реагентов для клинических лабораторий. Их применение позволяет значительно упростить многие аналитические процедуры и сделать их экологически более чистыми, поскольку ферментативные методы не нуждаются в едких или летучих реагентах и высокой температуре реакции. Особенно удобно применять их в автоматических анализаторах, использующих фотометрию в качестве завершающего этапа, так как при этом можно обойтись легко автоматизируемыми операциями : отмериванием, инкубацией и фотометрией. Ферменты как реагенты используются в качестве вспомогательных и индикаторных ферментов в энзиматических тестах, а как специфические катализаторы - при количественном определении метаболитов.

Ферментные реагенты в клинической лаборатории используются практически только в форме готовых наборов реактивов промышленного изготовления. Чаще всего это сухие порошки, полученные путем лиофилизации. Перед употреблением их необходимо растворить в предписанном инструкцией объеме воды, чаще всего - в том же флаконе, в котором упакован порошок. Срок годности растворенного реактива, конечно, значительно меньше, чем сухого порошка. Следует иметь в виду опасность наличия в воде солей металлов, которые могут тормозить некоторые ферментные реакции, а другие, нежелательные, наоборот, катализировать. Могут отрицательно повлиять на результаты исследования и некоторые органические примеси. Поэтому качество воды, используемой в лаборатории, представляет не только технический интерес, и оправдывает расходы, необходимые для приобретения аппаратуры для эффективной очистки воды от возможных примесей. С этой точки зрения более надежны жидкие реактивы, поскольку их качество гарантировано изготовителем.

Такие высокоспецифичные ферменты как уриказа, уреаза и глюкозоксидаза широко используются в наборах реагентов для соответствующих рутинных исследований содержания мочевой кислоты, мочевины и глюкозы. Применение менее специфичных ферментов становится также возможным за счет использования ферментных аналитических систем, основанных на сопряженных реакциях, причем первый из ферментов может обладать лишь относительной специфичностью (например, гексокиназа в системе для определения глюкозы способна превращать в 6-фосфорные эфиры наряду с глюкозой и другие сахара), а второй фермент обеспечивает специфичность общего результата исследования (в данном

примере эту специфичность обеспечивает глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа). Использование нескольких ферментов в качестве последовательных этапов исследования основано на их хорошей совместимости в общем объеме реакционной среды.

Многие химические методы определения метаболитов дают завышенные результаты, так как присутствующие в сыворотке соединения со сходной структурой реагируют аналогично определяемому метаболиту. Например, в методе определения пирувата, основанном на образовании гидразона с 2,4-динитрофенилгидразином, другие кетокислоты, встречающиеся в сыворотке, реагируют так же, как пируват, что приводит к завышению результатов определения пирувата. Специфичность действия ферментов как реагентов позволяет при их применении не подвергать исследуемую биологическую жидкость предварительной очистке, которую обычно проводят для избежания интерференции. Так, определение пирувата по реакции с НАДН с использованием в качестве катализатора фермента лактатдегидрогеназы является специфическим только для пирувата. К другим метаболитам, которые определяются с применением ферментов как катализаторов, относятся АТФ, АДФ, АМФ, этанол, глюкоза, α-кетоглютарат, мочевина, мочевая кислота, холестерин, креатинин.

Наиболее широко применяются методы исследования, в которых определяется количество продуктов катализируемой ферментом реакции по достижении ею равновесия (так называемые методы «конечной точки»). Оптимальным вариантом таких реакций являются те, при которых происходит практически полное превращение субстрата в метаболит. Если такое полное превращение на первом этапе реакции не достигается, может быть дополнительно осуществлено с помощью подходящего фермента преобразование первоначального продукта во вторичный, что позволяет уже полностью обеспечить измерение всего количества исследуемого субстрата.

Количество субстрата, превращаемого в процессе катализируемой ферментом реакции Q, является функцией концентрации активного фермента [E] согласно уравнению $Q = k_1 \times [E] \times t$, где k_1 - это константа скорости реакции, а t - время реакции. Следовательно, количество субстрата , превращенного в продукт реакции, пропорционально количеству фермента, присутствующего в реакционной среде. Поэтому ферментные методы «конечной точки» требуют соответствующего количества фермента для каждой пробы, чтобы избежать чрезмерно длительного инкубационого периода. Поскольку концентрация субстрата падает до низкого уровня к концу

реакции, для определения скорости реакции важна величина константы Михаэлиса фермента K_m: чем ее величина меньше, т.е. чем выше сродство фермента с субстратом, тем более фермент пригоден для метода исследования данного субстрата по «конечной точке».

Каталитическая активность ферментов зависит от температуры; концентрации водородных ионов (pH среды), от активаторов и ингибиторов их действия. Однако ферментные методы «конечной точки» проявляют весьма малую чувствительность к изменениям условий реакции - количеству фермента, постоянству температуры или pH.

Некоторое неудобство ферментных методов заключалось в довольно длительном времени инкубации. Снижение количества фермента и сокращение времени, необходимого для выполнения анализа, достигается в т.наз. кинетических методах, при выполнении которых измеряется не общее количество превращенного субстрата, а измеряются изменения, произошедшие за определенный временной интервал. Скорость катализируемой ферментом реакции при начальной высокой концентрации субстрата соответствует кинетике нулевого порядка, а при снижении концентрации субстрата в ходе реакции переходит в фазу кинетики первого порядка. Основное свойство кинетических реакций первого порядка состоит в том, что изменение концентрации субстрата за фиксированный интервал времени прямо пропорционально начальной концентрации субстрата. Константа скорости реакций первого порядка равна отношению максимальной скорости реакции к константе Михаэлиса для данного фермента.

Методы, в процессе которых свойства, связанные с концентрацией субстрата, измеряются в два фиксированных временных отрезка, именуются «двуточечными» кинетическими методами. Эти методы теоретически точнее методов «конечной точки», однако они более требовательны к соблюдению постоянства условий реакции - pH, температуре и количеству фермента. Сохранение такого постоянства условий реакции облегчается выполнением исследований на автоматических анализаторах. Несмотря на более высокие технологические требования «двуточечные» кинетические методы получают все более широкое применение.

При определении метаболитов ферментативными методами количественная оценка результата может проводиться фотометрическим или электрохимическим способом, причем непосредственным предметом количественной оценки целесообразно использовать содержание относительно простого продукта, образующегося в процессе самых различных химических аналитических процедур. Значительная часть фермен-

тативных методов заканчивается либо определением перекиси водорода, либо измерением концентрации восстановленного НАД.Н или НАДФ.Н, т.е. наиболее универсальных продуктов биологического окисления (Таблица 17)

Таблица 17

Завершающие этапы ферментативных методов

Аналиты	*Перекись водорода*	*НАД.Н*	*НАДФ.Н*
Аммиак			+
Глюкоза	+		+
Креатинин		+	
Молочная кислота	+		
Мочевая кислота	+	+	
Мочевина			+
Неэстерифицированные жирные кислоты	+		
Пировиноградная кислота		+	
Триглицериды	+	+	
Фосфолипиды	+		
Холестерин	+		

О количестве образовавшейся перекиси водорода можно судить либо по потреблению кислорода, служащего источником ее образования, либо непосредственно определяя само вещество. Такую возможность предоставляют электрохимические методы (см. соответствующий раздел). Значительно чаще применяются фотометрические методы, основанные на способности перекиси водорода в присутствии соответствующих ферментов окислять бесцветные органические соединения с образованием ярко окрашенных продуктов. В присутствии фермента пероксидазы перекись водорода окисляет фенольные соединения с образованием ярко окрашенных продуктов красного цвета, которые удобно фотометрировать. Достаточно широко применяется предложенный в 1969 г. Триндером для определения глюкозы способ с использованием в качестве субстрата смеси парааминофенола и фенола (отсюда сокращенное английское наименование метода PAP) и образованием перекиси водорода. В качестве вариантов этого метода применяются системы, приводимые в таблице 18.

Наиболее вероятная причина погрешностей при использовании аналитического метода, заканчивающегося пероксидазной реакцией, это

Таблица 18

Системы, используемые в вариантах РАР-метода

Фермент	*Субстрат*	*Длина волны при фотометрии*
Пероксидаза	4-Аминоантипирин +фенол	500 (492 - 550) нм
Пероксидаза	4-Аминофеназон +фенол	510 (470 - 560) нм
Пероксидаза	4-Аминофеназон +фенол + +дихлорфенол	510 (470 - 560) нм
Пероксидаза	Диаммониум -1,2"-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат)	610 (560 - 620) нм
Пероксидаза	N-этил-N-(в-сульфоэтил-) m-590 нм толуидин +2-гидразон-2,3-дигидро-3-метил-6-сульфобензоат	
Пероксидаза	4-Аминопирин +2,4-дихлорфенол--сульфофталеин	
Каталаза	Метиловый спирт*	400 - 420 нм
Каталаза	Этиловый спирт **	340 нм

Примечания :

* Метиловый спирт окисляется перекисью водорода до формальдегида, который образует цветное окрашивание с ацетилацетоном.

** Этиловый спирт окисляется перекисью водорода до ацетальдегида, который окисляется НАД.Н.

разрушение части перекиси водорода под влиянием каталазы, в результате чего образуется молекулярный кислород, который не окисляет субстрат. Источником каталазы может быть недостаточная очистка исходных ферментативных препаратов, загрязнение солями металлов, обладающих свойствами каталазы, и сам биологический материал, в частности, богатые этим ферментом эритроциты. Хотя предприятия- изготовители наборов реактивов прилагают большие усилия для предотвращения подобных погрешностей, иногда их не удается предотвратить. Поэтому существует тенденция к использованию ферментных методов с образованием или расходованием восстановленной формы НАД.Н или НАДФ.Н, что более надежно.

В то же время наборы реактивов для этих методов дороже, чем для РАР-методов, а измерение продуктов реакции в области ближнего ультрафиолета, на которую приходится лишь небольшая часть энергии лампы накаливания, требует более сложного и дорогого измерительного прибора. В случае применения ртутной лампы, не имеющей в своем спектре

линии оптимальной длины волны 340 нм, используют близкие линии с длинами волн 334 нм и 365 нм, на которых оптическая плотность меньше. Поскольку молярные коэффициенты оптических плотностей НАД.Н и НАДФ.Н хорошо известны, некоторые фирмы-производители наборов реактивов предлагают использовать метод расчета результатов, не нуждающийся в калибровочном графике, при котором величину оптической плотности умножают на заранее известный коэффициент. Этот подход связан с необходимостью строгого соблюдения условий выполнения реакции, состава среды и длины волны, поскольку только для этих условий действителен предлагаемый фирмой коэффициент. Для уверенного применения коэффициента рекомендуется тщательно проверять результаты, используя контрольные сыворотки.

До внедрения ферментативных методов исследование биожидкостей обязательно начиналось с депротеинизации путем осаждения белков и удаления их после центрифугирования во избежание выпадения белков в осадок в процессе самого анализа. Ферментативные реагенты белки не осаждают, тем не менее для предотвращения помутнения сыворотки или плазмы может потребоваться добавление в среду поверхностно-активных веществ для предотвращения помутнения раствора из-за накопления побочных продуктов реакции (например, жирных кислот) или избытка окрашенного вещества на конечном этапе. При исследовании цельной крови депротеинизация необходима, однако при соблюдении нейтральной реакции среды, чтобы буфер мог обеспечить оптимальное значение pH для используемого в методе фермента. Лучше всего для этой цели подходят соли урана; если же применяются кислоты, они должны быть нейтрализованы достаточно крепкими растворами щелочи.

Хотя для выполнения исследований требуется относительно небольшое количество ферментного белка, высокая стоимость хорошо очищенных препаратов ферментов несколько ограничивает сферу их рутинного применения. Сокращение расхода ферментных реактивов может быть достигнуто за счет уменьшения объема пробы и размера фотометрической кюветы, что возможно в автоматических анализаторах, но довольно затруднительно при ручной работе из-за сложностей операций с микрообъемами биологического материала.

Более экономичным способом использования ферментов в клиническом лабораторном анализе представляется их иммобилизация на том или ином носителе, что позволяет полностью использовать их способность многократно, не разрушаясь, катализировать необходимый для анализа

процесс превращения субстрата. Иммобилизация ферментных молекул осуществляется путем их химической связи с такими абсорбентами, как микрокристаллическая целлюлоза, диэтиламиноэтилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, агароза. Для связывания ферментного белка с нерастворимым носителем (мембраной или стенкой сосуда) используются диазо-, триазин - и азидогруппы. Для иммобилизации чаще всего применяются такие ферменты, как гексокиназа, уреаза, глюкозооксидаза, трипсин, лейцинаминопептидаза, α-амилаза. Иммобилизованные ферменты стабильнее, чем ферменты в растворе, по отношению к нагреванию и другим способам инактивации, однако, некоторые их свойства, например, константа Михаэлиса и оптимум pH, могут изменяться.

Иммобилизованные ферменты рациональнее всего могут быть использованы в аналитических системах, которые предназначены для прямого определения искомого аналита, без дополнительного включения сопряженных ферментов и коферментов. Количественная оценка результатов катализируемых в этих системах реакций может экономично осуществляться с помощью потенциометрических, полярографических или микрокалориметрических устройств. Нередко ферменты наносят на поверхность ионселективного электрода (см. выше), с помощью которого измеряется количество иона, участвующего в катализируемой ферментом реакции(например, чувствительный к кислороду электрод, покрытый слоем, содержащим глюкозооксидазу, измеряет содержание глюкозы в растворе по количеству кислорода, использованного в реакции окисления глюкозы; аммоний-чувствительный электрод может быть совмещен с мембраной, содержащей уреазу).

Эта схема применения иммобилизованных ферментов является одним из вариантов их включения в состав биосенсоров, т.е. устройств, преобразующих эффект специфического взаимодействия с аналитом, основанного на биологических закономерностях, в сигнал, поддающийся обработке электронным компонентом этого устройства (рис.56). К созданию такого рода устройств в последнее время привлечено большое внимание, поскольку это один из способов быстро и специфично определить наличие и содержание искомого аналита у постели пациента при неотложных состояниях, в практике семейного врача, самим пациентом в домашних условиях. Прибором такого типа является анализатор глюкозы «Эксан -Г», получивший довольно широкое применение в нашей стране.

Иммобилизованные ферменты служат одним из важных компонентов аналитических систем одноразового использования : диагностических

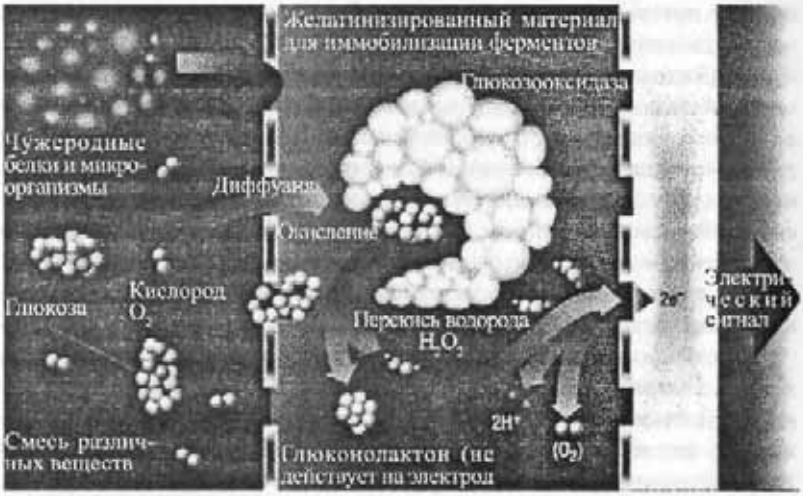


Рис. 56. Схема использования иммобилизованного фермента глюкозооксидазы в биосенсорном анализаторе глюкозы («Prufgerate-Werk Medingen GmbH», Германия).

полосок, многослойных аналитических элементов, некоторых иммунохроматографических тест-кассет (см. раздел «Лабораторные реагенты»).

Широкое поле для аналитического применения нашли ферменты в качестве меток при проведении иммуноферментных исследований (см. раздел «Методы, основанные на специфическом связывании»).

Методы, основанные на специфическом связывании

В большом арсенале методических приемов современной клинико-диагностической лаборатории почетное место занимают методы, основанные на специфическом связывании исследуемого вещества лигандами - природными или синтетическими соединениями, имеющими высокое сродство к аналиту. В подавляющем большинстве случаев речь идет об иммунохимической реакции - связывания исследуемого белка (аналита), который согласно иммунохимической терминологии является антигеном, со специфическим белком - антителом. Однако в иммунохимической реакции антигеном может быть и низкомолекулярное вещество, в этом случае оно называется гаптеном. В настоящее время в лабораторной аналитике чаще всего в качестве лигандов используются антитела, значительно реже другие белки, например, транспортные или клеточные белки-мишени гормонов. В последнее время появились сообще-

ния о разработке нового класса лигандов - аптамеров (от латинского глагола aptus – «соответствовать», «точно подходить»). Это целое семейство синтетических одноцепочечных олигонуклеотидов РНК и ДНК, среди которых, как выяснилось, можно найти представителя, обладающего очень высоким сродством почти к любому искомому соединению .

В качестве антител в лабораторной диагностике используются белки класса IgG, входящие в группу гамма-глобулинов. Их молекулы состоят из тяжелых и легких цепей, сложенных таким образом, что молекула имеет форму латинской буквы Y, на обеих ножках находятся одинаковые гипервариабельные участки (т.е. такие участки, аминокислотный состав которых у разных антител очень различен), это и есть рецепторы - связывающие участки (рис.57). Тем самым каждая молекула антитела может соединяться с двумя молекулами антигена. На поверхности антигена в

Рис.57. Схема молекулы антитела IgG (По Buffone, 1987). Указаны углеводы (Cbh) , дисульфидные мостики, и основные фрагменты, образующиеся при протеолитической ферментативной обработке [F(ab'')$_2$, Fc, Fab, Fd].

свою очередь имеется много различных детерминант - участков, с которыми может специфически связываться рецептор антитела. Эти детерминанты самые разные, поэтому против молекул антигена одного сорта может быть выработано много различных антител, но каждое антитело содержит два одинаковых рецептора, поэтому может связываться только с одним определенным участком (детерминатом) антигена. Если молекула IgG встречает две молекулы белка, содержащие детерминанты, с которыми она может связаться, образуется мостик, соединяющий молекулы антигена. За счет подобных мостиков могут образовываться и более крупные конгломераты.

Различают моноклональные и поликлональные антитела. В первом случае речь идет об антителах все молекулы которых одинаковы, их рецепторы имеют сродство (направлены) против одних и тех же детерминат (участков поверхности) антигена, поликлональные же антитела представляют собой смесь антител против разных участков поверхности одного и того же антигена. Поэтому моноклональные антитела очень специфичны, но не очень чувствительны в том смысле, что для проведения иммунохимической реакции нужна их высокая концентрация. Поликлональные же антитела могут в буквальном смысле слова облепить молекулу антигена, поэтому реакция более выраженная, но менее специфичная - вероятность того, что у разных антигенов среди многих детерминант окажется несколько схожих значительно выше, чем вероятность того, что конкретная детерминанта будет присутствовать у двух разных антигенов. Поликлональные антитела получают традиционым способом - иммунизируя животное, моноклональные - размножением в тканевой культуре потомков одной и той же клетки , так называемого клеточного клона, все клетки которого вырабатывают одинаковые молекулы антител против одной и той же детерминанты (участка поверхности) антигена, поскольку произошли от одной и той же клетки. Если данный набор антител - поликлональных или реже моноклональных - реагирует не только со «своим» антигеном, но и с другими - говорят о перекрестных реакциях. Существуют антитела очень широкого спектра действия, например, против всех белков крови какого-нибудь вида животных, или наоборот, очень избирательные.

Созданные в последнее десятилетие, благодаря новым методам генной инженерии и химического синтеза, аптамеры оказались серьезными конкурентами моноклональных антител. Их преимущество в том, что это чисто синтетические соединения, химическая структура которых извес-

тна, поэтому их всегда можно наработать в нужном количестве и нужного качества. В то же время моноклональные антитела- это природные соединения, никто не знает, какая именно последовательность аминокислот обеспечивает формирование нужного рецептора. Моноклональные антитела подбирают методом проб и ошибок, выделяя тот клеточный клон, который вырабатывает наиболее специфические белки, однако, никогда нельзя гарантировать, что это самые специфичные, может быть, самого специфичного клона в данной популяции и нет. Если линия клеток - производителей погибла, восстановить производство в точности таких же антител уже невозможно. Аптамеры лишены этих недостатков, поэтому среди них удается найти вещества, обладающие на порядок большим сродством к аналиту . Слабое место аптамеров на основе ДНК или РНК нуклеотидов - их чувствительность к действию содержащихся в биологическом материале ферментов нуклеаз, способных быстро разрушить любую ДНК или РНК цепочку. Чтобы преодолеть эту трудность используют олигонуклеотиды (Рис.58), в которых некоторые гидроксильные группы рибозы или дезоксирибозы заменены на метильную или аминогруппу, или же на фтор.

Методами избирательного связывания определяется много самых разнообразных веществ, хотя в своем большинстве это белки, но также по-

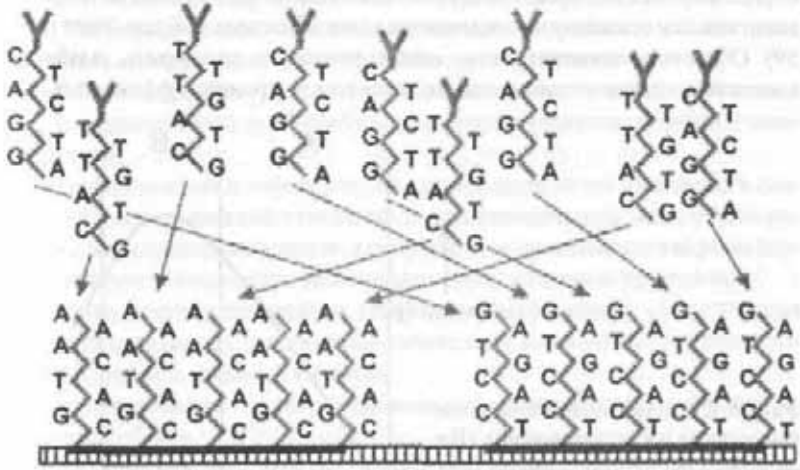


Рис. 58. Принцип использования олигонуклеотидов в лигандных технологиях (по Ekins, 1998).

липептиды, гормоны небелковой природы и лекарства. В любом случае задача заключается в том, чтобы сделать видимым образовавшийся комплекс, *который отличается от исходных компонент - аналита и лиганда*, в первую очередь, большим размером. Все иммунохимические методы, как и другие, основанные на связывании лигандами, в той или иной форме используют это обстоятельство.

Закономерности образования крупных комплексов антиген-антитело несколько отличаются от других вариантов связывания с лигандами тем, что 1)антитела имеют по две связывающих ножки, 2)на антигене много детерминант. Если антител мало, меньше чем молекул антигена, то самые большие комплексы могут состоять только из двух молекул аналита, соединенных мостиком из антитела. При увеличении количества антител могут образовываться и более крупные комплексы, в которых несколько молекул антигена соединены аналогичным способом. Такие крупные комплексы плохо растворимы и выпадают в осадок (преципитат), что лежит в основе реакции преципитации.

Если же имеется избыток молекул антитела, (их больше, чем детерминант с которыми они связываются), комплекс растворяется, потому что антитела только одной ножкой подсоединяются к антигенам, для второй нет свободной детерминанты. Преципитация возможна только при определенном (эквивалентном) соотношении концентраций антигена и антитела, эти отношения описываются кривой Кендела-Гайдельберга (рис. 59). Область эквивалентности можно несколько расширить, подбирая соответствующие условия, однако, целиком устранить эффект нельзя.

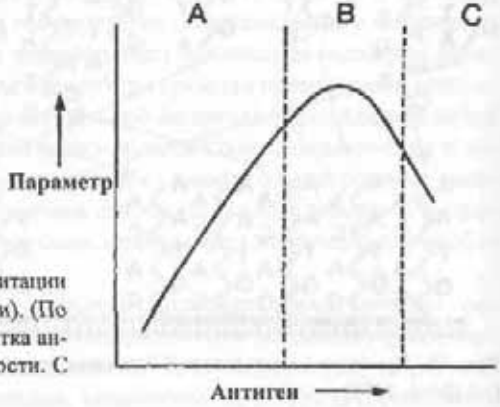


Рис. 59. Схема кривой преципитации (применима и к агглютинации). (По Buffone, 1987). А - зона избытка антитела. В - зона эквивалентности. С - зона избытка антигена.

В классическом варианте на проведение реакции антиген-антитело уходили часы, или даже сутки, однако оказалось, что это время можно значительно сократить, проводя реакцию в растворе, содержащем 30-50 г/л полиэтиленгликоля (ПЭГ) - высокомолекулярного соединения, связывающего значительный объем воды, что снижает растворимость белка, ускоряет процессы в оставшемся свободном пространстве, приводит к повышению преципитации иммунного комплекса. и расширяет зону эквивалентности. Линейные полимеры повышают растворимость белков обратно пропорционально своей молекулярной массе.Кроме полиэтиленгликоля для ускорения реакций антиген-антитело применяют декстран, полипропиленгликоль, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, модифицированную целлюлозу.

Признаком того, что наступило специфическое связывание, является образование комплекса аналита и лиганда, который отличается прежде всего более крупными размерами молекулы. В некоторых случаях эти комплексы настолько велики, что выпадают в осадок - образуется видимый на глаз преципитат. Иногда, чтобы определить количество комплекса, его отделяют от непрореагировавшего продукта - это будет гетерогенный анализ, если же об образовании комплекса судят по появлению каких-то новых свойств молекул - это называется гомогенным анализом.

Хотя терминологию нельзя считать полностью устоявшейся и случается, что разные авторы не совсем одинаково употребляют одни и те же названия, можно выделить следующие группы методов:

- иммунодиффузия - преципитация комплекса антиген-антитело в геле,
- иммуноэлектрофорез - комбинация методов иммунодиффузии и электрофореза,
- турбидиметрия и нефелометрия - оценка количества выпавших в осадок (преципитировавших) комплексов антиген-антитело по мутности раствора, нефелометрия отличается от турбидиметрии тем, что в первом случае измеряется количество рассеянного света, во втором прошедшего,
- конкурентное связывание (сатурационный анализ) - определение количества антигена, связанного с антителами по их остаточной способности связывать меченый антиген,
- метод сэндвича - определение количества белка, фиксированного на иммуносорбенте,
- латекс-агглютинация - склеивание взвешенных в растворе микрочастиц латекса, загруженных антителами в присутствии соответствующего антигена,

- поляризация флюоресценции - оценка размера комплекса антиген-антитело по особенностям флюоресценции в поляризованном свете,

- блотинг - образование окрашенного пятна на том месте, где произошло связывание аналита.

И в методе конкурентного связывания, и в методе сэндвича речь идет об определении количества вещества, связавшегося с антителами, но в первом случае измеряется количество оставшихся свободными валентностей, во втором - количество связанного белка. Метод сэндвича чаще всего имеет иммуноферментное (ELISA) либо иммунофлюоресцентное (IFA) окончание, сатурационный анализ -радиоимунное (RIA) окончание, хотя тут возможны варианты. Оба метода часто объединяют одним названием immunoassay, которое на русский язык можно перевести более широким понятием иммуно-химического исследования или иммунопробы.

Ниже приводится краткая характеристика наиболее распространенных методов, основанных на специфическом связывании аналита.

Многие иммунохимические процессы осуществляются в полужидкой среде : в геле агара или агарозы. Такая среда позволяет иммунным телам диффундировать и смешиваться, а также наблюдать полосы их преципитации. *Пассивная диффузия* в геле может быть *одиночной*, когда устанавливается градиент концентрации для одного реактанта (например, антигена), а среда импрегнирована антителом. Вариантом этого метода является радиальная иммунодиффузия. *Двойная* диффузия характеризуется установлением градиента концентраций и для антигена, и для антитела (двумерная иммунодиффузия, метод Ouchterlony). Этот метод позволяет сравнивать два исследуемых материала и устанавливать идентичность или неидентичность антигенов в них. Наиболее простой вариант этого метода проводится в чашках Петри, наполненных агаром. В одну из лунок наносится антитело, в две других - антигены : известный и неизвестный. При их идентичности образуется одна сплошная дугообразная полоска преципитации, при их неидентичности - две пересекающиеся полоски. При близости, но не идентичности антигенов образуется одна сплошная полоска преципитации и другая, не пересекающая ее (частичная идентичность). Четвертый вариант позволяет в третью лунку поместить два антитела.

Радиальная иммунодиффузия. служит методом количественного определения белков.. Исследуемое вещество (аналит) и антитело (реактив) диффундируют в геле навстречу друг другу, в результате создаются противоположные по направлению градиенты концентраций реактива и ана-

лита. В определенном месте их соотношение таково, что выпадает осадок (преципитат) - чем больше присутствует исследуемого вещества, тем дальше оно успевает продиффундировать и создать нужную для образования осадка концентрацию. Преимущество этого метода его простота, он не нуждается в сложной аппаратуре, поэтому очень подходит для небольших лабораторий, где исследуются малые серии. В то же время метод трудоемок и не может быть автоматизирован. Все исследование выполняется на специальных пластинках, на поверхности которых закреплен слой геля, содержащий специфические антитела. В геле имеются лунки, обычно расчитанные на внесение 5 мкл исследуемой пробы; чтобы предотвратить высыхание во время инкубации пластины закрываются крышками. Исследуемый материал вносится в лунки согласно инструкции к набору, обычно без предварительного разведения и какой-либо обработки, так как изготовляемые в промышленных условиях пластины уже расчитаны на определенную концентрацию вещества, которая может быть в конкретной биологической жидкости. Одновременно с пробами на той же пластине ставят три различных концентрации калибратора, в качестве которых могут быть использованы только специальные, приготовленные в промышленных условиях и откалиброванные по калибраторам более высокого уровня, растворы исследуемого белка. Исследуемый антиген диффундирует в гель, при этом образуется зона преципитации в виде круга, обычно видимая на глаз, но иногда возникает необходимость в специальном красителе, который делает зону преципитации более отчетливой.

Пластины инкубируются при комнатной температуре 24-72 часа, длительность зависит от определяемого антигена и оговаривается инструкцией к набору. За это время вокруг лунки формируется зона преципитации, диаметр которой измеряется с помощью специальной линейки с точностью до 0,1 мм. Расчет выполняется по калибровочному графику, при построении которого исходят из того факта, что концентрация исследуемого белка (антигена) пропорциональна квадрату диаметра преципитата. Компьютеризированный ридер(считыватель) для пластинок с радиальной иммунодифузией (The Binding site, Англия) позволяет объективизировать определения, выполняемые этим методом (рис. 60). Пластины после проведенной диффузии помещаются на площадку ридера над источником света и оцениваются по двум изображениям треугольных светодиодов, расположенных на противоположных сторонах кольца преципитации. Результаты опытных и контрольных проб рассчитыва-

Рис. 60. Компьютеризированный ридер для чтения результатов радиальной иммунодиффузии Computerized RID plate reader («The Binding Site», Англия).

ются автоматически в соответствии с выбранной программой калибровочной кривой (по диаметру или по площади колец преципитации) и выводятся на экран прибора в величинах диаметров колец преципитации, их площади и концентрации исследуемых белков.

В целом метод достаточно надежен, однако присутствие в одной из проб необычных белков (например, моноклональной природы), которые быстро диффундируют и попадают в места расположения других преципитатов, может повлиять на результаты в соседних лунках. Также чрезвычайно большая концентрация исследуемого белка может привести к образованию зоны преципитации, в которой нарушены обычные соотношения между радиусом и количеством антигена. Надо иметь в виду также, что маленькие молекулы антигена диффундируют быстрее больших, поэтому при том же количестве белка радиус зоны преципитации больше. Это имеет значение при определении гаптоглобина, у которого размер молекулы фенотипа 1-1 значительно меньше, чем фенотипа 2-1 или 2-2.

При наличии в исследуемом биологическом материале нескольких антигенов они могут быть разделены с помощью *иммуноэлектрофореза*, который проводится в слое геля агарозы, помещенном на тонкую стеклянную или пластиковую пластинку. Проба биоматериала подвергается электрофоретическому разделению, а затем в бороздки, параллельные направлению движения разделяемых белков, помещается антисыворотка. В результате взаимонаправленной диффузии белков из пробы и антител из бороздок с антисывороткой образуются дугообразные полоски иммунопреципитации соответственно расположению индивидуальных белков (рис.61). При сравнении с известной контрольной сывороткой белки могут быть идентифицированы.

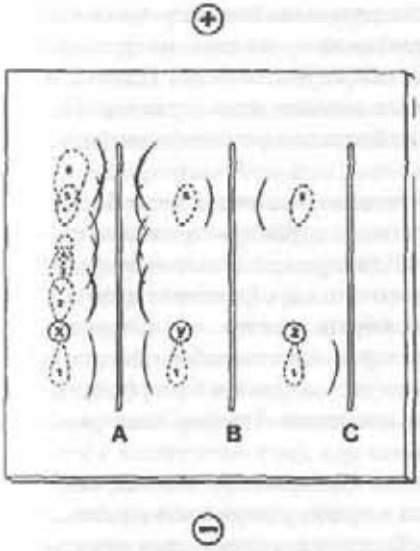


Рис. 61. Схема проведения иммуноэлектрофореза на геле агара/агарозы для разделения и идентификации белков (По *Buffone, 1987*). В лунки x, y, и z вносят одинаковую смесь белков и проводят их электрофоретическое разделение. В бороздки A, B, и C вносят три разные антисыворотки, содержащие, соответственно, антитела к пяти белкам, к двум белкам и к одному белку. Гель инкубируют во влажной камере при 4 °С в течение 24 - 72 час. Дуги преципитации отражают зоны контакта соответствующих антигенов и антител

При необходимости положение специфических полосок преципитации может быть зафиксировано с помощью их окрашивания и фотографирования.

Для более детального анализа состава белков с более высоким разрешением может проводиться *поперечный иммуноэлектрофорез* с разделением компонентов в двух направлениях.

Противоточный иммуноэлектрофорез основан на взаимопротивоположном движении антител под влиянием сил электроэндоосмоса, а молекул антигена в процессе электрофоретического перемещения к аноду.

При *иммунофиксации* после проведения однонаправленного иммуноэлектрофореза на различные зоны геля наносятся специфичные антисыворотки. Иммунопреципитаты связываются с гелем, а остальные непреципитировавшие белки удаляются промыванием геля. Окрашивание геля позволяет наблюдать и идентифицировать исследуемые белки.

Электроиммуноисследование или «ракетный» иммуноэлектрофорез представляет собой вариант метода, при котором градиент концентрации устанавливается для одного лишь антигена, как и при радиальной иммунодифузии, однако приложение напряжения побуждает нанесенный в лунки антиген двигаться в сторону гомогенной суспензии антител в геле. При их контакте образуются заостренные «ракетообразные» линии

преципитации, размер которых пропорционален концентрации антигена. Сравнение со стандартом, нанесенным на ту же пластинку, позволяет проводить количественную оценку исследуемого белка. Поскольку калибровочная кривая для этого метода линейна лишь в узком диапазоне концентраций,исследуемую пробу приходится соответственно разводить или концентрировать.

Измерение мутности. Для определения индивидуальных белков широко используются нефелометрическое и турбидиметрическое измерение мутности, которая возникает, когда агрегаты антиген-антитело достигают таких размеров, что выпадают в осадок (преципитируют). Проблема заключается в том, чтобы подобрать условия, при которых реакция развивается быстро и сигнал измерительного прибора по возможности однозначно связан с количеством исследуемого белка (антигена) в пробе, однако пропорциональности, аналогичной закону Ламберта-Бера, тут не бывает.

Как правило, нефелометрические и турбидиметрические иммунохимические исследования проводятся в среде, содержащей полиэтиленгликоль (ПЭГ), в присутствии которого удается определить содержание антигена по светорассеянию (мутности) уже через несколько минут после начала реакции. Практически количественные иммунохимические турбидиметрические и нефелометрические исследования стали реальностью только после внедрения ПЭГ, который сейчас присутствует во всех прописях реактивов. Это, однако, не значит, что реакция антиген-антитело стала такой же линейной, как и биохимическая - калибровочный график в любом случае нелинейный.

Чувствительность нефелометрических методов значительно возрастает, если иммунные антитела адсорбированы на латексе - мелких частицах полимерной пластмассы, чаще всего полистирола. На каждой частице латекса адсорбируется много молекул иммуноглобулина, она превращается как бы в огромную частицу, содержащую антитела, более крупную, чем молекула антигена. Антиген и антитело меняются местами - теперь уже молекулы антигена (определяемого вещества) образуют мостики между частицами латекса потому, что на поверхности каждой из них много участков (детерминат), к которым подсоединяются адсорбированные на латексе иммунные антитела. При этом чувствительность реакции увеличивается, и избыток антигена не препятствует реакции. Этот принцип реализуется в виде двух различных лабораторных методов - латексовых тестов и так называемой латексной или усиленной частицами

турбидиметрии (particle-enhanced turbidimetric immunoassay, PETIA). В случае латекс-теста качественный результат читается визуально - есть агглютинация или ее нет. В случае же усиленной частицами турбидиметрии измерения выполняются на фотометре.

Ошибки нефелометрических методов в значительной степени связаны с растворением иммунных комплексов в избытке антител. Кривая Кендела-Гейдельберга, связывающая мутность раствора с концентрацией антигена, имеет горбообразный характер, ее пик соответствует области эквивалентности концентраций. Вне него одно и то же показание прибора соответствует двум различным концентрациям антигена - одной на восходящей ветви кривой, другой на нисходящей. Поэтому расчет не может выполняться по обычному калибровочному графику. Узнать, какому участку кривой соответствует данный результат, можно измерив одновременно скорость накопления агрегатов, т.е. мутности, которая измеряется аналогично тому, как измеряется кинетика ферментативных реакций. Для выполнения таких исследований нужен специальный прибор и набор реактивов, параметрам которых этот прибор соответствует и которые он учитывает при расчете. Практически параметры реактива (так сказать, его калибровка) записываются на флаконе в виде штрих-кода, получается закрытая система, которая работает только с реактивами той же фирмы, которая изготовила прибор. Это необходимо иметь в виду, когда приобретается оборудование.

Количественное измерение мутности может проводиться в двух вариантах - турбидиметрическом, когда измеряется интенсивность прошедшего света, и нефелометрическом, когда измеряется его рассеяние (см. раздел «Нефелометрические методы»). Турбидиметрия удобна тем, что ее можно проводить на том же фотометре (или биохимическом анализаторе), который используется и для общебиохимических исследований, хотя существуют и специализированные турбидиметры для иммунохимических определений. При работе на универсальном приборе измерения стараются выполнить на самой короткой длине волны, где еще нет специфического поглощения света белками, обычно это 340 нм (или близкая к ней величина), поскольку в коротковолновой области рассеяние света больше. Чувствительность турбидиметрических методов в целом меньше, чем нефелометрических, а помех больше, так как количество прошедшего света зависит не только от светорассеивания агрегатами антиген-антитело, но от поглощения среды, например, в случае иктеричности сыворотки или гемолиза. Диапазон рабочих концентраций также уже, так как для того, что-

бы надежно измерить количество преципитата, он должен рассеивать не менее 10-20% падающего света, иначе различие трудно уловить на общем фоне. Большие потери света также трудно точно измерить.

Нефелометрия, т.е. измерение рассеянного света, позволяет значительно расширить диапазон измерений, так как можно улавливать и очень маленькие, и очень большие величины рассеяния. Измерения можно выполнять и на нефелометре, и на флюорометре. Различие между этими приборами состоит только в том, что при нефелометрии длина волны первичного (падающего) света, которым освещается раствор, и вторичного, в данном случае рассеянного, одинакова, поэтому нет необходимости во вторичном светофильтре. При флюорометрии раствор освещается светом, длина волны которого меньше, чем длина волны излучаемого, поэтому требуется два светофильтра (или два монохроматора) - первичный и вторичный. Если же они оба одинаковы, или вторичного вообще нет, флюорометр можно использовать как нефелометр.

При нефелометрии абсолютное количество рассеянного света не имеет большого значения, так как чувствительность прибора обычно велика. Если нужно измерить количество частиц безотносительно их формы и размера, удобно работать в красной области спектра: длина волны больше и спектр частиц, которые ведут себя как релеевские, шире.

Источники ошибок и помех при нефелометрии и турбидиметрии очень похожи. Это в первую очередь различные частицы, которые могут быть биологического происхождения, т.е. присутствовать уже в самой исследуемой пробе. Сюда относятся различные клетки, хиломикроны, сгусточки фибрина или криоглобулинов, от них следует избавляться тщательным центрифугированием. Другой источник ошибок это микробы и грибки, развившиеся в самой пробе в результате нарушения ее стерильности, или в используемых реактивах и посуде. При турбидиметрии есть дополнительный источник ошибок - присутствие сильно поглощающих веществ (иктеричность, гемолиз).

Часть ошибок, связанных с высоким фоном, можно устранить, изучая динамику развития мутности, подобно тому, как это делается при кинетических биохимических исследованиях. Сигнал измеряют сразу же после того, как исследуемый материал смешан с реактивом, и через некоторое время, когда иммунохимическая реакция уже завершена, или по крайней мере близка к завершению. Двух- (или более) точечное измерение, когда в расчет берется разность величин до и после иммунохимической реакции, позволяет избавиться от влияния «неспецифической»

компоненты светорассеяния, кроме того в распоряжении исследователя появляется дополнительный параметр - скорость протекания реакции, что позволяет правильно выбрать участок калибровочного графика.

Другие причины ошибок и неточностей присущи всем вариантами иммунохимических определений. Это прежде всего неправильный выбор диапазона концентраций - когда количество исследуемого белка слишком велико или мало относительно возможностей тест-системы. Неправильные результаты могут получиться и при исследовании сывороток, богатых ревматоидным фактором (РФ), поскольку это антитела класса IgM против IgG, т.е. как раз тех белков, которые в данном случае выполняют функцию реактива. Их присутствие может нарушить нормальное течение иммунохимической реакции.

Латекс-тест. Избежать растворения агрегата иммунных комплексов в избытке антител, и тем самым сделать эффект реакции видимым, можно *неспецифически адсорбировав антитела на каких-либо частицах*. Такая частица становится как бы очень большой молекулой антитела. Добавление достаточной концентрации антигена проводит к склеиванию (агглютинации) этих частиц, чему избыток антигена не препятствует. Исторически этот подход берет начало от *реакции агглютинации эритроцитов*, когда в качестве частиц-носителей антигена использовались красные клетки крови, однако, в дальнейшем оказалось значительно удобнее использовать синтетические полимеры, обычно шарики полистирола, размером 80-1000 нм. В продажу поступают уже загруженные соответствующими антителами и взвешенные в буферном растворе частицы под названием «латекс-тест». К набору прилагаются контрольные сыворотки, дающие положительную и отрицательную реакции. Иногда взвеси подкрашивают красителями разных цветов, чтобы сразу было видно, о каком исследовании идет речь.

Постановка реакции латекс-агглютинации очень проста. На стеклянную или пластмассовую пластину, на темном фоне наносят немного исследуемой сыворотки и реактива и перемешивают. Результат читают через 2-3 минуты, покачивая пластину. Ответ дается в качественной форме - есть склеивание частиц (агглютинация) или нет. Метод не калибруется, для количественной оценки используют метод разведений - разводят сыворотку физиологическим раствором и учитывают то максимальное разведение, при котором еще наступает агглютинация.

Одновременно с серией опытов ставят положительный и отрицательный контроли - сыворотки, в которых заведомо присутствует или заведо-

мо отсутствует исследуемого белок. В липемических сыворотках чтение результата может быть значительно затруднено; присутствие ревматоидного фактора (антитела против иммуноглобулинов) в крови больного может привести к ложно-положительным результатам теста - агглютинация наступает не потому, что присутствует искомый белок (аналит), а потому, что на частицах латекса адсорбированы антитела - IgG, которые реагируют с ревматоидным фактором.

Иммунопробы (immunoassay). Это широкая, но хорошо очерченная группа методов, которые в зависимости от используемого варианта и фирмы, выпускающей реактивы, имеет разные названия. Общее, наиболее употребительное английское название immunoassay точнее всего может быть переведено на русский язык как иммунная проба. В любом случае иммунохимическая реакция, проводится так, чтобы в системе накопилось меченое соединение, количество которого однозначно связано с количеством определяемого белка. Меченым оно называется потому, что содержит группу, которую легко определять, оно называется также меткой, употребляются и английские слова «Label», «Tracer», «Marker». Чаще всего метка соединена с антителом, этот комплекс называется конъюгатом. В качестве метки может выступать:

- радиоактивное вещество, тогда метод называется радиоиммунным,
- фермент, тогда это иммуноферментное исследование,
- (хемо)люминесцирующее вещество - тогда это иммунолюминисцентный метод,
- флюоресцирующая группа, в том числе с использованием флюоресценции с разрешением во времени или поляризации флюоресценции - тогда метод иммунофлюоресцентный.

Существуют два типа иммунных проб - конкурентный метод и метод бутерброда - сэндвича.

Исторически конкурентный метод (его называют также методом конкурентного связывания или сатурационного анализа) появился раньше. Суть его заключается в том, что ограниченное количество иммунных антител или другого лиганда адсорбировано на каком-то носителе (подложке) - стенке пробирки, гранулах или более мелких частицах. В систему добавляется исследуемая проба и известное количество аналита, меченого какой-то группой, для определения которой существует чувствительный и надежный метод - например, по радиоактивности, флюоресценции или ферментативной активности (Рис.62). Так как количество иммунных тел или в общем случае лиганда ограничено, идет конкуренция - чем больше в

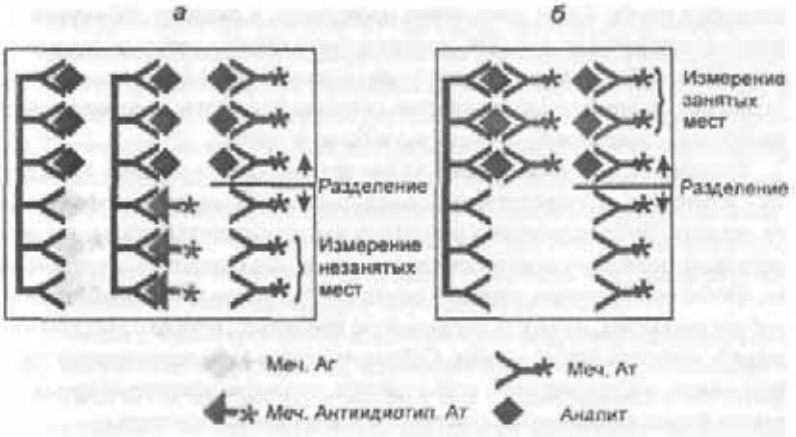


Рис. 62. Принцип лигандной аналитической технологии. а - конкурентная иммунологическая технология; б - неконкурентная иммунологическая технология. Меч А - меченый антиген. Меч Ат - меченое антитело. Меч антиидиотипич Ат - меченое антиидиотипическое антитело.

пробе аналита , тем меньше свяжется его меченого аналога и наоборот, чем ниже концентрация аналита, тем больше свяжется метки. После завершения реакции, связавшуюся с лигандом фракцию отделяют от свободной - тут существуют разные методы, чаще всего лиганд исходно был связан с подложкой, поэтому связанную фракцию можно отделить центрифугированием или просто отмыванием, и определяют количество метки. Это так называемый гетерогенный анализ(гомогенном - см. ниже).

В некоторых прописях определяют количество метки, которое связалось с лигандом, в этом случае оно находится в обратных отношениях с содержанием аналита, в других вариантах то, которое не связалось, его количество возрастает при увеличении концентрации аналита. В любом случае между ними нет линейной пропорциональности и расчет выполняется по калибровочной кривой.

Метод сэндвича также относится к группе гетерогенных иммунных проб. Он основан на том, что каждый белок имеет много детерминант - участков, к которым могут подсоединяться антитела, причем антитела также *являются белками, которые могут связываться с соответствующими антителами*. В этом случае на подложке адсорбированы специфичные антитела против исследуемого белка, способные связать все его количество, име-

ющееся в пробе. Когда связывание произошло, в систему добавляют не очень специфичные меченые антитела (конъюгат), которые садятся на исследуемый белок, уже связанный с подложкой. Избыток меченых антител отмывают, и определяют количество связавшейся метки, которое пропорционально содержанию исследуемого белка в пробе.

Разделение всех иммунопроб на две группы - конкурентных и сэндвича - ,в которых непосредственно определяется либо количество связанного аналита, либо количество незанятых им валентностей, на самом деле условное, поскольку можно определять сразу оба параметра, нужно только, чтобы они метились разными метками. Это усложняет и изготовление набора реактивов, и саму аналитическую процедуру, однако позволяет увеличить точность исследования. Сейчас именно в этом направлении работает мысль исследователей, есть надежда, что через некоторое время появятся новые варианты иммунопроб, с повышенной точностью.

Фирмы, выпускающие наборы для иммунных проб, называют их по-разному - часто говорят об иммуноферментном определении (ИФА) или иммуносорбции, употребляется и английская аббревиатура ELISA - Enzym Linked Immunosorbent Assay, иммунолюминесценция и иммунофлюоресценция (ELFA -Enzyme Linked Fluorescent Assay) . Разумеется, каждый набор предполагает использование совершенно определенного оборудования.

Наиболее распространено иммуноферментное определение (ИФА) по принципу сэндвича в одноразовых планшетах, каждый из которых имеет 96 лунок и рассчитан на исследование 96 проб. На дне и стенках лунок уже в заводских условиях адсорбированы нужные антитела. Возможен и другой вариант, когда в продажу поступает не планшет, а так называемый strip - полоска эквивалентная 1/12 планшета, т.е. на 8 проб. Выпускаются планшеты и на иное количество лунок. Планшеты и стрипы, как правило, взаимозаменимы. В планшет вносят исследуемые сыворотки с буферным раствором, инкубируют, после чего не связавшиеся с антителами белки удаляют, отмывая специальным промывочным буферным раствором. На следующем этапе в лунки вносят конъюгат - малоспецифические антитела против человеческого белка, к которым подсоединен (конъюгирован) фермент. Избыток этих антител тщательно удаляют несколькими промываниями. Затем вносят субстратно-буферный раствор и проводят обычную ферментативную реакцию, количество образовавшегося продукта реакции пропорционально числу молекул фермента, которые связались с исследуемым белком, т.е., в конечном счете, концентрации исследуемого белка в пробе.

Все варианты гетерогенных иммунных проб требуют выполнения многих последовательных операций связывания и отмывания. Трудно добиться того, чтобы каждая из них проходила до конца. Кроме того, результат в большой степени зависит от качества иммунных тел и способа их получения. По этим причинам в каждой серии исследований (на каждой плашке) ставят несколько калибровочных проб, по которым и проводится расчет. Калибровочный график, как правило, нелинейный, вычисления выполняются встроенным в ридер микропроцессором, что точнее, чем вручную, хотя такой путь тоже возможен. В любом случае надо выбрать форму калибровочного графика, что требует определенного опыта.

Поскольку многочисленные аналитические операции - дозирование проб, инкубации, встряхивание, ферментативная реакция, отмывание - проводятся в тех же лунках, в которых были адсорбированы антитела, для проведения на многолуночных планшетах всех предусмотренных методом процедур применяются разнообразные устройства, позволяющие стандартизовать выполнение процедур в каждой лунке и рационализирующие работу персонала.

Семплеры - устройства для дозирования проб - по существу являются развитием идей автоматического многоканального дозирования: от многоканальных пипеток для ручных методов до управляемых компьютерными программами высопроизводительных устройств, индивидуальных или встроенных в автоматические приборы для иммунохимического анализа. Так, MICROLAB MPH - 96 («Hamilton») способен выполнять различные операции, связанные с пипетированием, включая серийное разведение во всем планшете на 96, 384 или 1536 лунок (рис.63). Инкубатор-шейкер (*«Insel», Англия) обеспечивает встряхивание* (мотор шейкера регулируется в пределах от 0 до 1300 оборотов в минуту) при быстром и равномерном прогреве до двенадцати 96-луночных планшетов одновременно при колебаниях температуры в пределах± 1°С (рис. 64). Процессор для микропланшетов на 24, 96 и 384 лунки XL 2020-008 Microplate System , включающий также программируемый Sonicator («Medonix», США), за счет приложенной энергии ультразвука значительное ускоряет течение реакций и сокращает длительность исследования (рис.65). Конструирование промывателей для планшетов учитывает наличие планшетов с различным числом лунок, возможность работы в ручном или автоматическом режиме, наличие лунок с различной конфигурацией дна (плоское, круглое или коническое), различие параметров отмывки (число циклов, необходимость применения нескольких буферных растворов, объем подаваемого в

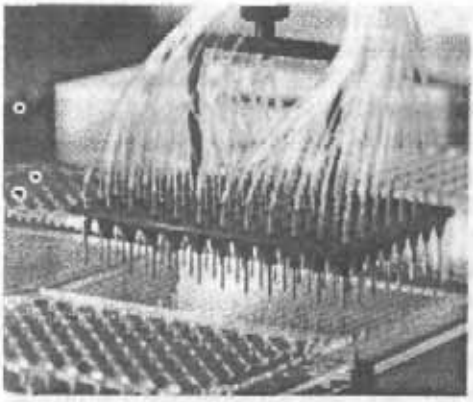


Рис. 63. Многоканальное дозирующее устройство MICROLAB MPH - 96 («Hamilton», Англия).

Рис. 64. Инкубатор-шейкер («Insel», Англия), рассчитанный на 12 96-луночных микропланшетов, с регулировкой скорости мотора от 0 до 1300 об/мин, при точности соблюдения заданной температуры ± 1 °С.

лунки раствора, скорость его подачи и удаления, положение каналов моющего узла относительно стенок и дна лунки при внесении и отсасывании раствора, замачивание планшета с промывочым раствором, встряхивание планшета между циклами отмывки и др). В зависимости от потребностей лаборатории и применяемой методики могут быть рационально применены различные модификации промывателей. Так, компания «Bio-Tek Instruments» (российский дистрибьютер «Био Лайн») предлагает ручной промыватель для планшетов и стрипов EL 401(8-ми или 12-канальный), автоматический 8-ми или 12-канальный промыватель ELx 50 для 96-луночных планшетов и отдельных стрипов с любой конфигурацие дна лунок с встроенным микропроцессором для программирования до 55 протоколов по всем параметрам отмывки (рис. 66) , автоматический 96-каналь-

Рис. 65. Ультразвуковой процессор мощностью 600 ватт для ускорения реакций в 24-, 96- , 384-луночных планшетах Misonix XL 2020-008 Microplate System с Misonix XL2020 Programmable Sonicator («Misonix», США).

ный промыватель ELx405 для 96-луночных планшетов со встроенным микропроцессором для программирования всех параметров отмывки (аналогично моделям серии ELx 50) со скоростью отмывки 30 сек. (3 цикла по 300 мкл раствора на лунку), некоторые модели этой серии предназначены и для работы с 384-луночными планшетами, или обладают модулем для автоматического переключения четырех промывочных растворов, или располагают магнитным держателем планшетов для удержания магнитных бусин, используемых в методике. Автоматическое устройство для обработки микропланшетов Assist («Labsystems Oy», Финляндия) позволяет последовательно загружать до 20 96-луночных планшетов или 27 384-луночных микро-

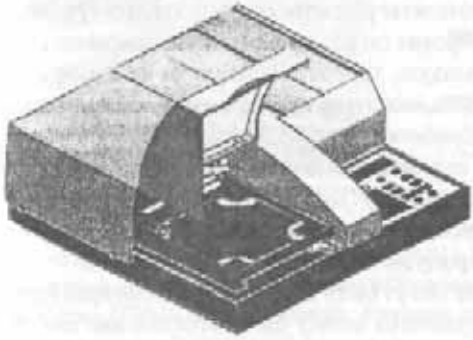


Рис. 66. Автоматический промыватель ELx50 для микропланшетов и стрипов с плоским, круглым и коническим дном со скоростью отмывки 96-луночного планшета (3 цикла) 128 сек («Bio-Tek Inastruments»).

планшетов Cliniplate. Как уже отмечалось в разделе «Оптические методы», для объективной оценки результатов иммунохимических исследований используются в качестве ридеров (англ. rider - считыватель) различные оптические измерительные приборы с вертикальным ходом луча: фотометры, спектрофотометры, флуорометры, люминометры. Упомянутая выше компания «Bio-Tek Instruments» предлагает несколько разновидностей таких приборов: переносной ридер EL301 для микролуночных стрипов на 8-, 12- и 2 x 8-лунок со светофильтрами 405 и 490 нм, универсальный автоматический ридер EL x 800 для 24-, 48, 96-луночных планшетов и отдельных стрипов с любой конфигурацией дна лунок, со светофильтрами на 405, 450, 490 и 630 нм, с измерением по конечной точке, автоматическим вычитанием результата измерения на референс-фильтре и автоматической обработкой результатов; многоканальный автоматический фотометр EL808 для 96-луночных микропланшетов и стрипов со встроенным шейкером и возможной комплектацией инкубационным модулем, с измерением по конечной точке и кинетическим, со сканированием лунок, автоматической обработкой результатов качественных и количественных тестов по 7 вариантам алгоритмов построения калибровочных кривых, с возможностью использовать различные ИФА-наборы отечественного и зарубежного производства; спектрофотометры MicroQuant (измерения по конечной точке, режим определения спектров поглощения, автоматизированная обработка данных, скорость измерения 96 лунок - 20 сек.); серия спектрофотометров Power Wave (двухлучевая оптическая схема, измерения по конечной точке и кинетические, сканирование лунок, режим определения спектров поглощения, автоматизированная обработка данных, встроенный инкубационный модуль и шейкер, скорость измерения 96 лунок - 45 сек.); флуорометры для планшетов FL x600 (режимы измерения флюоресценции, люминесценции и абсорбции, планшеты различного формата, измерения с поверхности и дна лунок, измерения по конечной точке и кинетические, встроенный инкубационный модуль, скорость измерения 96 лунок - 30 сек., измерения кинетики в отдельных лунках, программное обеспечение для управления прибором и обработки результатов) и FLx800 (режимы измерения флюоресценции и люминесценции, измерения по конечной точке, планшеты различного формата и ПЦР-пробирки, измерение с поверхности и со стороны дна лунок, автоматизированная обработка данных при помощи встроенного микропроцессора).

В другом варианте антитела могут быть адсорбированы на гранулах, в этом случае для чтения результатов может быть использован любой

фотометр, пригодный для фотометрии на соответствующей длине волны, но остальные лабораторные операции усложняются.

Блотинг - этим словом обозначаются методы, в результате которых образуется пятно, в первую очередь радиоактивное, которое проявляется наложением на фотопленку. Различают Соутерн блотинг, который позволяет *идентифицировать ДНК (точнее отдельные ее фрагменты) путем гибридизации* с меченой радиоактивным изотопом библиотечной (известной) ДНК, так называемой сДНК. Если обе нуклеиновые кислоты одинаковы, происходит их гибридизация (образование двойной спирали), радиоактивная метка закрепляется, в противном случае удаляется. Нортон блотинг по принципу аналогичен, но используется для идентификации РНК. В случае Вестерн блотинг речь идет об идентификации белков, обычно с помощью иммунохимической реакции. На рис. 67 изображен набор реагентов Вестерн блотинга антител против ВИЧ-1 антигена Novapath HIV-1 Western blot, Immunoblot(«Bio-Rad») и результат идентификации белка при выраженной и слабой реакции. Иммуноблотинг - по существу, это один из упрощенных вариантов сэндвич-метода, когда аналит специфи-

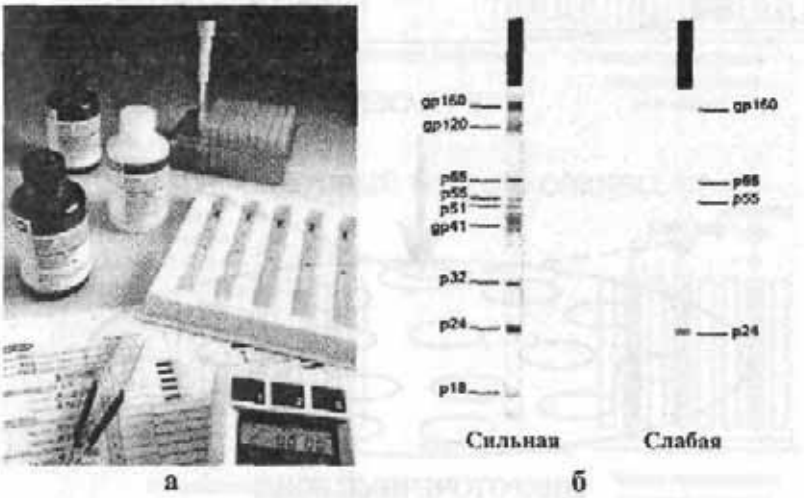


Рис. 67. Набор для качественной пробы с идентификацией специфических антител против антигена HIV-1 Novapath HIV-1 Western Blot («Bio-Rad»). **а** Комплект компонентов набора. **б** Пример выявления сильной и слабой реактивности антигена HIV-1с использованием Novapath Immunoblot Assay.

Рис. 68. Схема микроточечного измерения реакций специфического связывания.

чески абсорбируется на содержащей реактив подложке, и в результате последовательных реакций развивается окрашенное пятно.

Современные методы иммунологического анализа становятся все более чувствительными, позволяя проводить определения в микроточечном варианте, когда для исследования аналита достаточно аналитической площади радиусом 10 мкм (рис. 68), или на аналогичном по площади участке клеточной мембраны, с ионным каналом которой связано антитело, специфичное по отношению к исследуемому аналиту (рис. 69). И тот, и дру-

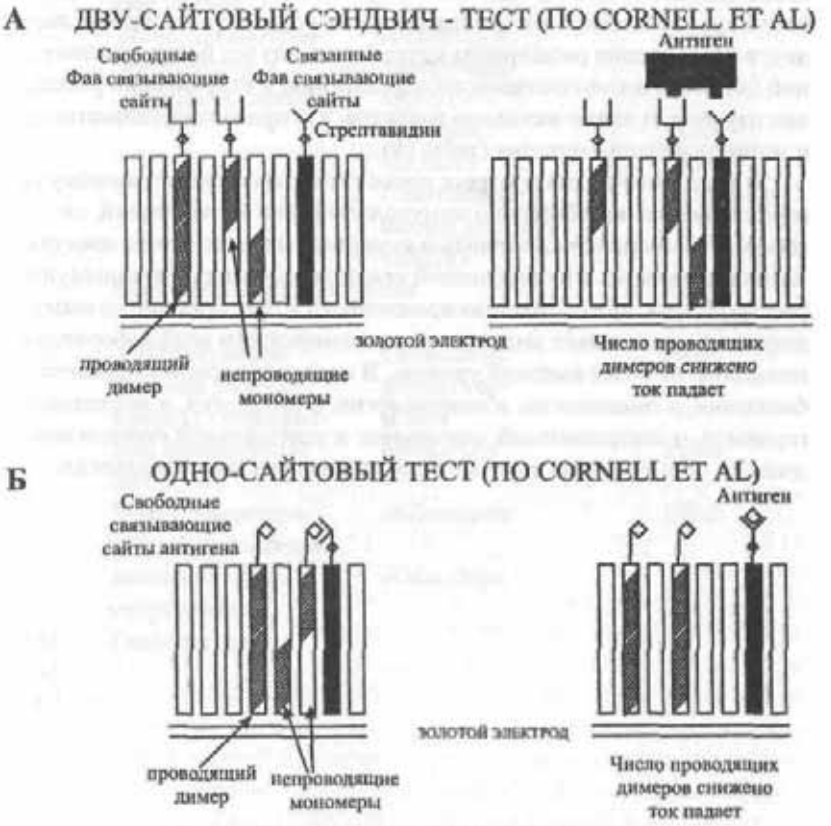


Рис. 69. Схема иммуносенсорных технологий (по Cornell et al.,1997).
А. Двусайтовый сэндвич - тест. **Б**. Односайтовый сэндвич - тест.

гой вариант позволяют конструировать миниатюрные многопараметрические аналитические системы, основанные на принципе специфического связывания. С помощью генно-инженерных антител, неизотопных меток, современных анализаторов, оснащенных микропроцессорами, предел обнаружения аналитов иммунохимическими методами понизился до уровня значений порядка центомолей ($1 \cdot 10^{-21}$) и йоктомолей ($1 \cdot 10^{-24}$).

Таким образом, развитие лигандных технологий за последнюю треть XX века со времени открытия Берсоном и Яллоу принципа специфического связывания шло в нескольких направлениях: в направлении расширения круга белковых, а в последнее время - олигонуклеотидных лигандов; в направлении расширения круга меток для все более чувствительной детекции и количественного определения; в направлении расширения изучаемых этими методами аналитов; в направлении автоматизации и миниатюризации методик (табл. 19)

Этот аналитический прогресс привел не только к существенному усовершенствованию собственно иммунологических исследований, т.е. способов точной оценки клеточных и гуморальных механизмов иммунной защиты организма и их нарушений при аллергических и аутоиммунных расстройствах, при состояниях врожденного и приобретенного иммунодефицита, но и вывел аналитические возможности всей лабораторной медицины на более высокий уровень. В настоящее время и клиническая биохимия, и гематология, и коагулология, и цитология, и исследования гормонов, и лекарственный мониторинг в значительной степени опираются на обширный арсенал методов специфического связывания.

Таблица 19

Развитие лигандных технологий

Декады	*Виды исследований*	*Аналиты*	*Авторы*
1950	Конкурентный радиолигандный анализ	Инсулин, (РИА)	Berson, Jalow
		Тироксин,	Ekins
1960	Сатурационный анализ		
1970	Меченые изотопами антитела и «сэндвич»-анализ	Антитела к аллергенам «RAST»	Wide
		Инсулин, «IRMA»	Miles, Hales
		Гомогенный анализ лекарств «EMIT»	Rubinstein
	Моноклональные антитела		Kohler, Milstein
1980	Ультрачувствительный иммуноанализ (специфичные неизотопные метки)	Свободные формы гормонов	Ekins
		«DELFIA»	Ekins
	Многопараметрический лигандный анализ на чипах-микрозондах	«Microspot»	Ekins
		«Genechip»	
1990	*Геносенсоры*		
2000			

V. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОК В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ АНАЛИТИКЕ

Микроскопия

Рассматриваемые выше методы исследования предназначены для детекции и количественного определения различных химических соединений в биологических жидкостях. Наряду с этим в клинико-диагностических лабораториях выполняются разнообразные исследования, основанные на визуальных наблюдениях лабораторных работников за клеточными или иными корпускулярными компонентами биоматериалов пациентов. Такая потребность возникает:

- при исследовании мочи, спинно-мозговой жидкости и других жидкостей организма;
- при подсчете клеток крови в счетных камерах;
- при дифференциальном подсчете лейкоцитов в мазках периферической крови;
- при исследовании клеток в мазках, соскобах, срезах тканей;
- при исследовании микроорганизмов, грибов, паразитов.

Для этих целей используются оптические приборы - микроскопы, позволяющие наблюдать увеличенное в десятки или сотни раз изображения изучаемых объектов (Рис.70).

Принципиальная схема оптической части микроскопа состоит из двух систем линз. Одна из них расположена в окуляре, т.е. устройстве для глаз наблюдателя. Окуляр вставляется в тубус - трубку, по которой свет от наблюдаемого объекта проходит к глазу наблюдателя. Вторая система линз находится в непосредственной близости к изучаемому объекту и поэтому называется объективом. Различными конструкциями микроскопов предусмотрено наличие одного или двух окуляров (монокулярные или бинокулярные микроскопы; последний вариант удобнее для наблюдателя, поскольку он имеет возможность наблюдать объект двумя глазами), нескольких сменных объективов, позволяющих подбирать желательные степени увеличения объекта. Объектив микроскопа выполняет функцию воспроизведения изображения наблюдаемого объекта с требуемым увеличением при разрешении элементов изображения, необходимом для их детального изучения, и при точном воспроизведении их по форме и цвету. Достижения современной оптики позволяют создавать такие оптические системы, которые отвечают самым строгим требованиям пользователей микроскопов. Естественно, что выбор объектива должен исходить из конкретной задачи,

Рис. 70. Схема современного микроскопа. (Olympus CH 30, компания «Olympus», Япония).
1. Окуляр. 2. Бинокулярный тубус позволяет регулировать расстояние между окулярами от 48 до 75 мм. Диоптрическое юстировочное кольцо компенсирует необходимую остроту зрения. 3. Поворотное кольцо для смены объективов. 4. Сменные объективы с различным увеличением. 5. Предметный столик. Устройство для регулировки позволяет перемещать объект на 76 мм x 50 мм. 6. Конденсор светового потока. 7. Станина. 8. Винт регулировки фокусирования с ограничительным устройством для предотвращения нежелательного контакта объектива с объектом наблюдения. 9. Винт регулировки интенсивности освещения.

стоящей перед исследователем, а также из экономических соображений, так как повышение оптических свойств объектива требует немалых расходов на получение высококачественной оптической среды и на прецизионную обработку деталей объектива. Объективы для микроскопов, обычно используемых в клинических лабораториях, должны быть ахроматическими, т.е. лишенными сферической и хроматической аберрации положения, астигматизма и частично сферохроматической аберрации (эти объективы дают изображения синевато-красного оттенка); некоторые фирмы оснащают клинические микроскопы ахроплановыми объективами, т.е. сочетающими ахроматические свойства с исправлением кривизны изображения для обеспечения равномерной резкости во всем поле наблюде-

ния. Детальные сведения об оптических схемах и устройстве различных типов микроскопов приведены в справочнике «Медицинские лабораторные технологии», соответствующий раздел которого (т. 1, стр. 30-60) создан специалистами ведущего российского центра научной оптики и оптико-механической промышленности.

Поскольку изучаемые с помощью микроскопии в клинической лабораторной аналитике клеточные и корпускулярные объекты весьма разнообразны по своим размерам и свойствам, для их адекватного изучения применяются различные методы, для реализации которых применяются различные конструктивные варианты микроскопов, отличающиеся по своим оптическим характеристикам.

При выборе микроскопа для того или иного вида исследований ориентируются на разрешающую способность прибора, которая измеряется наименьшим расстоянием между двумя точками, при котором они изображаются раздельно. (Эта характеристика аналогична чувствительности биохимических методов, которая оценивается по способности метода различить две близкие концентрации вещества). Разрешающая сила микроскопа зависит от свойств объектива, поскольку линзы окуляра лишь увеличивают изображение, получаемое с помощью объектива. Разрешающая сила может быть рассчитана по формуле:

$a = 0{,}61 \times l / n \sin \alpha$; где

a - минимальное разрешающее расстояние;

l - длина волны света, освещающего объект наблюдения;

n - показатель преломления иммерсионной среды;

α - угол между оптической осью и наиболее сильно отклоняющимся лучом, который еще попадает в объектив.

Из этого соотношения следует, что наиболее существенными способами повышения разрешающей силы микроскопа могут служить увеличение «угла зрения» объектива и повышение преломления среды, находящейся между препаратом и объективом. Объективы с большим увеличением имеют наибольший «угол зрения» объектива, который, однако, не может превысить 90°, а sin угла α не может быть больше 1. Увеличение преломления среды между объективом и препаратом осуществляется путем применения иммерсионного кедрового масла с показателем преломления 1,515 (для сравнения, вода - 1,33; воздух - 1). В сумме оба способа позволяют обеспечить размер численной апертуры (знаменатель формулы разрешающей силы) микроскопов с сухой системой наблюдения до 0,95, а с масляно-иммерсионной системой - до 1,4 .

Числитель формулы зависит от длины волны света, освещающего препарат. При зеленом свете (длина волны 0,55 мкм) предельная разрешающая способность прибора составляет 0,24 мкм; при фиолетовом - 0,18 мкм.

Обычно лабораторные микроскопы имеют несколько объективов, расположенных на карусели в нижнем конце тубуса, что позволяет во время работы легко сменять объективы, подбирая нужное увеличение изображения. В зависимости от увеличения объективы имеют различные рабочие фокусные расстояния от препарата, так, объективы:

- с увеличением х 10 имеют фокусное расстояние 15,98 мм;
- с увеличением х 40 - 4,31 мм;
- с увеличением х 100 - 1,81 мм (иммерсионный объектив).

Изучаемый объект обычно наносится на предметное стекло (или содержится в ином прозрачном контейнере), которое размещается на предметном столике, на который нацелен объектив микроскопа. В случае работы с иммерсией между фронтальной, т.е. ближайшей к объекту частью специального иммерсионного объектива, и самим наблюдаемым объектом размещается иммерсионная жидкость, обладающая показателем преломления близким к аналогичному показателю стекла фронтальной части иммерсионного объектива, что и дает эффект увеличения числовой апертуры и разрешающей способности объектива(до 0,12 мкм).

Второй важный компонент микроскопа - осветительная система. Предметное стекло освещается либо дневным светом, либо специальным источником света, причем луч света может падать на зеркало, отражающее его под прямым углом вверх напрямую или через конденсор с диафрагмой. Манипулируя верньером тубуса, перемещая предметный столик с предметным стеклом, направляя зеркалом освещение предметного стекла с препаратом, меняя объективы, наблюдатель подбирает условия для получения четкого изображения интересующего его объекта наблюдения. В некоторых современных конструкциях микроскопов применяются корреглирующие оптические системы для получения оптимальных изображений (Рис.71).

Инвертированный микроскоп с расположением оптической системы ниже предметного столика, а источника света выше него предоставляет возможность свободы микроманипуляций с объектом наблюдения, что важно для работы с культурами клеток (Рис.72).

С помощью *светового микроскопа* изучаются объекты, имеющие контрастные структуры, в том числе окрашенные, т.е. избирательно поглощающие лучи света определенной длины волны. Если объект не поглощает

Рис. 71. Схема хода лучей в микроскопе с оптической системой корректировки изображения (Olympus BX 60, компания «Olympus», Япония).

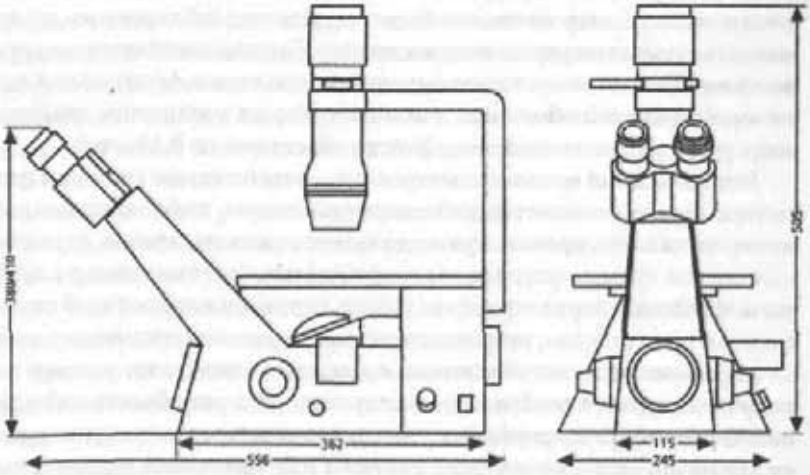


Рис.72. Схема устройства инвертированного микроскопа Axivert 25 (фирма «Zeiss», Германия).

видимую часть спектра, применяется освещение ультрафиолетовыми лучами, что требует использования в микроскопе кварцевой оптики.

Для наблюдения объектов, имеющих размеры меньше, чем разрешающая сила микроскопа, применяют освещение под таким углом, чтобы световые лучи от осветителя не попадали в объектив. Наблюдаемые объек-

ты становятся при этом видимыми как светящиеся точки на темном поле *(микроскопия в темном поле или ультрамикроскопия).*

Фазово-контрастная микроскопия, использующая разную скорость распространения света в средах с разной плотностью, значительно повышает контрастность изображения структур изучаемых объектов. Структуры, имеющие более высокий показатель преломления, видятся более темными или более светлыми (в зависимости от конструкции прибора) вследствие интерференции лучей, оказавшихся в разных фазах.

Поляризационные микроскопы, оснащенные двоякопреломляющими кристаллическими пластинками, позволяют выявлять структуры с двойным лучепреломлением (анизотропные), которые становятся видимыми как ярко светящиеся на темном фоне. Свойство анизотропности присуще структурам с упорядоченным расположением молекул (кристаллы, фибриллярные белки).

Интерференционные микроскопы также оснащены двоякопреломляющими пластинками, что позволяет делить свет на два пучка, один из которых проходит через изучаемый объект, а другой - минует его. Рекомбинация двух лучей, оказавшихся различными по фазе, приводит через преобразование сдвига фаз к изменению амплитуды, т.е. яркости, которая может быть измерена. Поскольку размер сдвига фаз зависит от плотности структуры, через которую прошел один из пучков света, интерференционная микроскопия позволяет вычислить массу структуры, сопоставив ее плотность с размером.

Свойство ряда веществ при облучении светом с короткой длиной волны светиться (флюоресцировать) используется при *флюоресцентной микроскопии* для выявления объектов как с первичной, т.е. собственной, флюоресценцией, так и с вторичной, вызванной окрашиванием специфическими красящими веществами - флюорохромами. В зависимости от характера свечения, присущего тому или иному флуорохрому, в микроскопах для исследования люминесценции и флюоресценции объектов применяются различные комбинации светофильтров для выделения необходимой длины волны света возбуждения и света излучения, как это осуществляется и при регистрации флюоресценции и хемилюминесценции в клинической химии. Некоторая особенность состоит в том, что светофильтр в зоне наблюдения оптической схемы имеет способность отсекать свет возбуждения, пропуская только излучаемый объектом свет. Кроме того, люминесцентные микроскопы оснащаются светоделительной пластиной, которая , отражая 90% света в спектральной области воз-

буждения люминесценции (400-550 нм) и пропуская 90% света в области излучения объекта (500-700 нм), делит падающий на объект световой поток от потока, формирующего изображение. В таблице 20 приведены рекомендуемые сочетания пластин и светофильтров в люминесцентных микроскопах отечественного производства.

Таблица 20

Рекомендуемые сочетания пластин и светофильтров при использовании различных флуорохромов (по В.Л.Войхонский и др., 1998)

Светоделительная пластина			*Рекомендуемые светофильтры (марка, нм)*		*Флуорохромы*
Маркировка	*Спектр: > 90%(нм)*				
	Отражения	*Пропускания*	*Возбуждения*	*Отрезающий*	
Зеленая	400-440	500-700	ФС1-5	ЖС18-2 и	Акридин оранж.
			ФС1-2	ЖС19	оливомицин,
			ФС1-4		зурамин-SO_2
			ФС1-6	ЖС18-3 и	Quinacrine mustard
			ФС1-8	ЖС19	
Зеленая 2	450-480	520-700	λ450-480		
			СС15-3	ОС11-2	ФИТЦ
			СС15-5	λ520-560	
			СС15-6		
Красная	520-550	610-700	λ546	КС11-2	Родамин,
			ЗС11-2	КС13-1	гематопорфирин,
			ЗС11-3	КС13-2	хлорофилл,
				ОС14-2	Texas Red
				ОС14-4	
Голубая	340-370	425-500	УФС6-5		DAPI,
			УФС6-3	ЖС3 ГС8	Hoehst
			УФС6-8		катехоламин

Получение на *световом микроскопе объемного изображения* объекта достигается за счет такой конструкции оптической системы, которая позволяет наблюдателю видеть объект одновременно каждым глазом под

своим углом зрения, как это имеет место при наблюдении невооруженным глазом. Один из вариантов стереомикроскопов состоит в сочетании раздельных оптических систем для каждого глаза (система Greenough). Другой вариант основан на телескопическом принципе, когда две оптические системы используют один объектив. При этом максимальная апертура около 0,25; разрешение около 1,3 мкм. Стереомикроскоп обеспечивает трехмерное изображение, однако, дает увеличение лишь до 150 - 200 раз.

Система *«микроскопии пространственного изображения»* отличается использованием в обычном световом микроскопе LCD модуляторов света. Один из них расположен у апертуры диафрагмы осветителя. Быстрая пульсация света, освещающего объект, синхронизированная с аналогичными модуляторами в обоих окулярах, обеспечивает поступление в мозг наблюдателя одновременно двух изображений объекта, что позволяет создать его трехмерное видение. При этом объект изучается на светлом поле с увеличением до 1000 раз с реальной цветопередачей при разрешении на 15% и с глубиной фокусировки в 2-3 раза больше, чем обычно. Трехмерное изображение может передаваться с помощью видеокамеры на монитор и наблюдаться одновременно несколькими зрителями через поляризационные очки.

Устройство *конфокального лазерного микроскопа* позволяет сканировать объект в трех измерениях и с помощью компьютера, сопоставляя до 20 срезов в разных позициях, формировать трехмерное изображение объекта, однако, не давая точной цветопередачи.

В *электронном микроскопе* роль линз выполняют электрические и магнитные поля, обладающие вращательной симметрией (Де Бройль, 1924 г.; Буш, 1926 г.). Пучок электронов, движущихся в вакууме с постоянной скоростью при ускорении их электрическим полем напряжением V, создает волновой процесс с длиной волны равной $12{,}21/\sqrt{V}$ мкм. Современные электронные микроскопы обеспечивают разрешение порядка 1,2 мкм, что дает увеличение изображения в 100-200 тысяч раз.

Проходя через изучаемый объект, электроны не поглощаются им, а рассеиваются, и поэтому, чем больше объект рассеивает электроны, тем более темным он представляется на флуоресцирующем экране микроскопа. Контрастность изображения рассчитывается по формуле: G=N1-N2/N1,где

G - контрастность изображения;

N1 - число электронов на 1 см2 одного участка;

N2 - число электронов на 1 см2 другого участка.

Применение специфических цитохимических красителей, в частности, солей металлов, позволяет значительно расширить исследовательские возможности электронной микроскопии применительно к выявлению на субмикроскопическом уровне локализации отдельных веществ - *ферментов, нуклеиновых кислот и т.п.*

Механические компоненты микроскопа : штатив, тубусодержатель, предметный столик - выполняют не только функцию крепления и обеспечения необходимого взаиморасположения оптических и осветительных компонентов, но и их точного перемещения в процессе фокусирования и наводки на резкость, создания оптимальных условий освещения, передвижения и ориентации исследуемого объекта. В этом отношении прецизионная механика микроскопа не менее важна, чем прецизионная оптика.

Получение желаемого результата при исследовании с помощью того или иного метода микроскопии в значительной степени зависит от соответствующей подготовки объекта исследования: мазка крови, цитологического или гистологического препарата и др.

Для изучения морфологии клеток в препаратах - мазках, соскобах, пунктатах, срезах тканей- обычно первоначально проводится их химическая фиксация с помощью коагулирующих белок веществ : четырехокиси осмия, хромовой кислоты, сулемы, уксусной или пикриновой кислоты. Для более быстрой и не вызывающей артефактов фиксации может применяться лиофилизация, т.е. быстрое замораживание при температуре жидкого азота с последующим высушиванием в вакууме. В широкой практике для фиксации мазков-отпечатков, соскобов и т.п. используют метанол и этанол , для фиксации срезов тканей 10% формалин и лиофилизация, для препаратов, исследуемых под электронным микроскопом - глютаровый альдегид (0,5 и 0,2%). С целью повышения контрастности клеточных структур применяется их *избирательное окрашивание,* основанное на противоположности зарядов красителя и вещества структуры (например, положительно заряженные структуры оксифильны, т.е. красятся кислыми красителями). Окрашивание специально подобранными красителями, избирательно реагирующими с отдельными химическими компонентами структур клетки, лежит в основе цитохимических исследований. Так, белки выявляются путем обработки препарата реактивами, специфически реагирующими с аминогруппами, сульфгидрильными или дисульфидными группами, либо с отдельными аминокислотами. Для выявления дезоксирибонуклеиновой кислоты может быть использована реакция Фельгена (слабый кислотный гидролиз, отщепление пури-

новых оснований, реакция альдегидных групп с фуксиносернистой кислотой с развитием красно-фиолетовой окраски). Рибонуклеиновые кислоты окрашиваются основными красителями (азур II, тионин). Окисление полисахаридов йодной кислотой вызывает образование альдегидных групп, реагирующих с фуксиносернистой кислотой (реактив Шиффа или PAS-реакция). Кислые мукополисахариды выявляются с помощью метахромазии, т.е. окрашивания некоторыми основными красителями (например, толуидиновым синим) в цвет, отличный от цвета самого красителя (в данном примере - в красно-фиолетовый). Липиды окрашиваются жирорастворимыми красителями (суданы красный и черный); отдельные их классы - с помощью специфических красителей. Неорганические вещества (железо, калий, фосфаты, кальций и др.) могут быть окрашены известными специфическими для этих ионов реагентами. Ферменты выявляются путем обработки препаратов субстратами этих ферментов с образованием продуктов реакции, имеющих окраску или поддающихся окрашиванию.

Для проведения фиксации и окраски мазков крови могут использоваться различные устройства. Приспособление ФОМК-2 (Украина) предназначено для фиксации и окраски мазков крови на предметных стеклах с минимальным расходом красителей для максимального количества предметных стекол. В состав приспособления входят: узлы (модули) фиксации, окраски, промывки и сушки предметных стекол, а также съемные кассеты для размещения предметных стекол. Приспособление имеет световую сигнализацию и обеспечивает установку длительности окрашивания мазков (от 2 до 30 мин.). Все процедуры выполняются вручную. Одновременно окрашивается 50 предметных стекол. Потребляемая мощность 20 ватт, напряжение 220 вольт. Габариты: 280 x 155 x 225 мм, масса 10 кг.

В автоматизированных устройствах для фиксации и окраски мазков крови используются два принципа:

1) Погружение мазков в краситель и извлечение из него;

2) Опрыскивание или заливка мазков красителем. Окрашенные мазки автоматически промываются дистиллированной водой или фосфатным буфером и высушиваются. При окрашивании неразведенными красителями с фиксатором - метанолом аппликация краски проводится в течение 1 мин., при использовании разведенных красителей - 3-5 мин. При автоматической работе приспособления действия оператора сводятся к подготовке устройства к работе и распределению в носителе. После завершения цикла окрашивания мазки остаются в этом носителе или по-

падают в емкость для мазков, а затем в камеру для высушивания в принудительном потоке воздуха. Варианты конструкции предусматривают:

1) Линейный транспорт мазков;

2) Поточно двигающиеся платформы ;

3) Центрифужные распылители.

При первом варианте корзины с мазками продвигаются специальными механизмами внутрь и вовне сосудов с реактивами, расположенных параллельно. В устройствах с платформами нанесение красителей осуществляется под действием капиллярных сил. Мазки располагаются в прорезях на спиралях контейнера и продвигаются окрашиваемой стороной вниз вдоль платформы, которая должна быть гладкой, без каких-либо царапин и повреждений. Мазки вступают в контакт с сенсорным переключателями, включающими насосы, распределяющие определенное количество красителя через отверстие в платформе в капиллярное пространство между нею и мазками. В течение определенного времени краситель остается над мазками, движущимися вдоль платформы, а затем стекает в жолоб, расположенный вдоль платформы. В центрифужных устройствах реактивы распыляются на мазки, расположенные во вращающейся карусели. Для удаления избытков реактивов и высушивания мазков их центрифугируют. Современные устройства для фиксации и окраски мазков крови имеют встроенные микропроцессоры, позволяющие программировать объемы реактивов, процедуру их розлива, временные параметры, вносить необходимые изменения в эти параметры в случае необходимости, наблюдать за ходом всех процессов на дисплее. На рис. 73 представлен прибор CELL-DYN SMS («Abbott Diagnostics», США), который способен автоматически выполнить все процедуры приготовления мазков крови, начиная с отбора крови из пробирки с образцом, включая нанесение мазка на пленку, печатание там же идентификационных данных о пациенте, проведение процедуры окраски по одному из 10 запрограммированных протоколов со скоростью до 120 проб в час. Некоторые варианты таких приборов используются только с реактивами фирм-изготовителей, т.е. являются закрытыми системами. В таблице 21 представлены характеристики ряда автоматических устройств для фиксации и окраски мазков крови.

Существуют также системы для фиксации и окрашивания гистологических препаратов.

Дальнейшим развитием цито- и гистохимического направления явилось использование меченых различными метками антител, направлен-

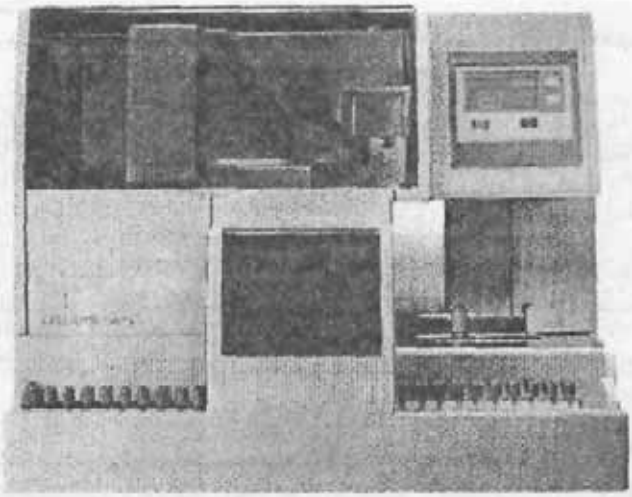


Рис.73. Автоматизированное устройство для приготовления, окраски и фиксации мазков крови Cell-Dyn SMS («Abbott Diagnostics»). Пробонакопитель на 50 *пробирок, смеситель проб, ридер штрих-кода, нанесение кода на слайд,* 5 окрашивающих устройств, промыватель, сушка с контролируемой температурой, возможность выполнения до 10 методов окрашивания, производительность до 120 мазков в час.

ных против определенных клеточных структур и их отдельных компонентов (*иммуноцито- и гистохимия*). Для этого направления используются различные варианты методов специфического связывания и разнообразные хромогены. Пример одной из таких систем для выявления антигенов в фиксированных формалином парафинированных срезах, свежих срезах и цитологических препаратах UltraTech-Nachweissysteme («Coulter-Immunotech Diagnostics») представлен на рис. 74. В этой системе за счет применения первичных немеченых антител, вторичных биотинилированных антител, меченых пероксидазой или щелочной фосфатазой и соответствующих этим ферментам хромогенных субстратов достигается значительное усиление детектируемого сигнала. Та же компания предложила автоматический прибор для окрашивания иммуногистологических препаратов, значительно облегчающий выполнение окраски по 48 различным протоколам.

Флюоресцентные методы цитохимии существенно обогащены использованием иммунных реакций с применением *меченых флуорофорами*

Таблица 21

Характеристика автоматических устройств для фиксации окраски мазков крови

Характеристика	Наименование устройства, фирма-изготовитель, страна				
	ПОМК-01 Ковровский электро-механический завод Россия	Hema-Tek 2000 Miles США	AVES-2 Helena Laboratories Франция	Linistain Shandon США	Veristain Lipshow США
Принцип работы	Платформа поточный	Платформа поточный	Линейный серийный	Линейный серийный	
Емкость носителя (предметных стекол)	25	5	32	6	60
Производительность, мазков/час		60	48	360	720
Тип носителя		Платформа	Корзины	Зажим	Корзины
Программирование	Свободное	Свободное	Свободное	Жесткое	Свободное
Краситель	Гемокрафикс (спиртовой краситель-фиксатор с метанолом)	Специальные упаковки для Hema-Tek	Райт-Гимза	Романовского-Гимза другие красители	
Температура высушивания	60 С	60 С	До 60 С	До 60 С	
Очистка	Ежедневная	Ежедневная очистка платформы и трубок с красителем	Не указано	Не требуется, 1 раз в неделю фильтрование красителя	

Рис. 74. Схема иммуноцитохимической системы выявления антигенов в препаратах тканей Ultra-Tech-Nachweissysteme («Coulter-Immunotech Diagnostics»).

моноклональных антител для выявления в клетках искомых компонентов в различных структурах. Этот принцип используется для поиска определенных тканевых антигенов и антител, для выявления клеточных рецепторов к различным регуляторным агентам и т.д.

Техническое совершенствование возможностей микроскопии проявилось в конструировании цитоспектрофотометров, электронных микроскопов, стереомикроскопов, конфокальных лазерных сканирующих микроскопов, роботизированных и автоматических компьютеризированных микроскопов.

Как и в других видах клинических лабораторных исследований, при микроскопии приходится прежде всего идентифицировать объект, т.е. по характерным чертам его изображения отнести к определенному классу (например, эритроцит, лейкоцит, тромбоцит в крови; клетка почечного эпителия, кристалл соли в осадке мочи; та или иная бактерия или мицелла гриба и т.д.). С клинической точки зрения важной задачей является

также поиск отклонений от обычных признаков объекта и от свойственного здоровым организмам количества объектов.

Количественная задача решается отнесением числа подсчитанных объектов к стандартному пространству препарата (отсюда формулировки: «в поле зрения», «в редких полях зрения», «в препарате») или к известному объему, например, как при подсчете эритроцитов в камере Горяева. Это устройство представляет собой стеклянную пластину, разделенную сеткой линий на 225 больших квадратов, в каждом из которых содержится по 16 малых квадратов. Глубина камеры составляет 0,1 мм, сторона малого квадрата равна 0,05 мм, следовательно, объем малого квадрата составляет 1/4000 мм^3. Эритроциты считают в 5 больших квадратах, а расчет их содержания в крови проводят, используя формулу:

$x = a \times 4000 \times в / c$, где

x - количество эритроцитов в 1 мкл крови;

а - число эритроцитов, сосчитанных в определенном количестве малых квадратов;

в - степень разведения крови;

с - количество малых квадратов, в которых подсчитывались эритроциты;

1/4000 - объем малого квадрата (при умножении его на 4000 приводим к 1 мкл крови).

По этой формуле, при разведении крови в 200 раз и подсчете в 5 больших (80 малых) квадратах количество эритроцитов в 1 мкл крови соответствует числу сосчитанных эритроцитов, умноженному на 10000.

Что же касается выявления объектов с необычными, патологическими чертами, то решение этой задачи зависит от наблюдательности и опыта исследователя, разнообразия и количества виденных им ранее исследуемых объектов, объема и прочности зрительной памяти. Особенно существенное значение эти качества микроскописта имеют при поиске патологических форм лейкоцитов при подозрении на злокачественные заболевания крови - лейкемии; при исследовании соскобов, пунктатов и срезов тканей в случаях предполагаемой опухоли. Однако в последнее время в современных моделях микроскопов все более важной функциональной частью становятся различные устройства для фиксации, анализа и телепередачи изображений, объективной детекции их структурных компонентов и химических свойств: фото- и видеокамеры, видеомониторы, спектрофотометры, компьютеры.

Цитоспектрофотометрия предназначена для определения количества веществ в клетках и основана на измерении поглощения ими лучей света определенной длины волны. Оптическая плотность структуры определяется формулой

D=lg To/T; где

D - оптическая плотность;

To - количество света, прошедшее через место препарата, не содержащее изучаемой структуры;

T - количество света, прошедшее через изучаемую структуру.

Измерение света производится с помощью фотоумножителя. Результаты измерения автоматически пересчитываются в количество вещества, поглощающего монохроматический свет определенной длины волны.

Микроскопы могут оснащаться устройствами для автоматического управления их работой, становиться частью автоматических исследовательских комплексов.

На рис. 75 представлен комплекс полностью автоматизированного высокочувствительного микроскопа AIM-8800 («Shimadzu Scientific Instruments»), в котором компьютер, оснащенный специальным программным обеспечением, управляет всеми необходимыми операциями, включая установку и центрирование пробы, установление апертуры и фокусирование, анализ размеров и площади объектов, со спектрофотометрами той же фирмы серии 8000 FTIR, в свою очередь, оснащенных мощными программами обработки данных фотометрии.

Механизация и автоматизация процесса микроскопии затрагивает различные компоненты устройства микроскопа. Так, в новейших системах микроскопов закладывается возможность различных способов возбуждения флюоресценции; формирования изображений в отраженном

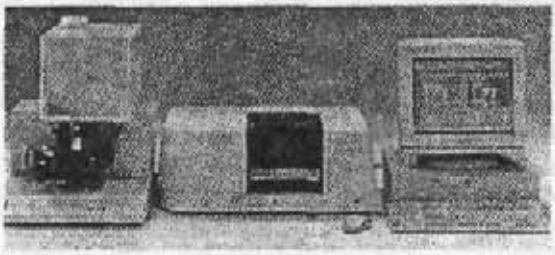


Рис. 75. Комплекс полностью автоматизированного микроскопа Shimadzu AIM-8800 FTIR Microscope со спектрофотометром Shimadzu 8000 FTIR Spectrophotometer («Shimadzu Scientific Instruments»).

свете, совершенствование устройства конденсора, позволяющее легко менять способ контрастирования объектов в проходящем свете; автоматическое управление диафрагмой и фильтрами с помощью микропроцессора и сервомоторов. Таким образом, в распоряжение исследователя предоставляется роботизированный микроскоп.

При необходимости современные микроскопы оснащаются устройствами для фиксации изображений исследуемых объектов с помощью фотографии или цифровой видеозаписи. Управление этим процессом через компьютер позволяет получать наилучшие варианты изображений. Дальнейшим шагом является подключение микроскопа в систему телемикроскопии для осуществления консультации у специалистов, находящихся в другом учреждении или в другом городе (Рис.76 1 и 2).

Полностью автоматизированные системы для микроскопии , наряду с автоматизацией самого процесса микроскопии, включают и компьютерный анализ, т.е. распознавание и классифицирование изображений. Такая система состоит из автоматизированного микроскопа, куда ручным способом вносят фиксированные и окрашенные мазки биоматериала. Система сканирует препарат, фиксирует изображения клеток, «просеивает» изображения с помощью высоко-сложной аналитической системы, основанной на принципе «нервной сети» (neural network). При этом учитываются различные характеристики клеток, включая цвет, размер, структуру, плотность, отношение ядро/цитоплазма, что позволяет классифицировать наблюдаемые клетки. На основе заложенной в базу данных компьютера библиотеки изображений клеток объекты, наблюдаемые в препарате, классифицируются и составляется отчет о проведенном анализе в виде заполненного бланка. Информация также может быть передана в лабораторную информационную систему. По команде оператора на экране монитора могут быть представлены изображения тех или иных полей препарата, отдельных клеток или их групп (популяций специфических клеточных элементов), подозрительных или аномальных клеток и т.д. (рис. 77).

Использование системы ускоряет анализ мазков, увеличивает пропускную способность лаборатории, объективизирует процесс и результат анализа, способствует стандартизации интерпретации микроскопических исследований и т. д. Системы автоматического анализа изображений разработаны и для флюоресцентной микроскопии (рис.78).

Таким образом, микроскопия, будучи первоначально лишь средством расширить возможности визуального наблюдения человеческим глазом клеток, т.е. по существу способом субъективного исследования, на ос-

Рис. 76. Система телемикроскопии MIGRA - Microscope Global Remote Access «Olympus Europa». **1.** Автоматическое формирование изображения исследуемого образца биологического материала с помощью полностью роботизированного микроскопа AX70 PROVIS, управляемого на расстоянии специалистом-патологом со стороны, принимающей изображение, регистрация изображения препарата цифровой фотокамерой и передача его через электронную почту . **2.** Дистанционная оценка переданного на расстоянии изображения биологического образца и диагностика патологии квалифицированным специалистом-консультантом.

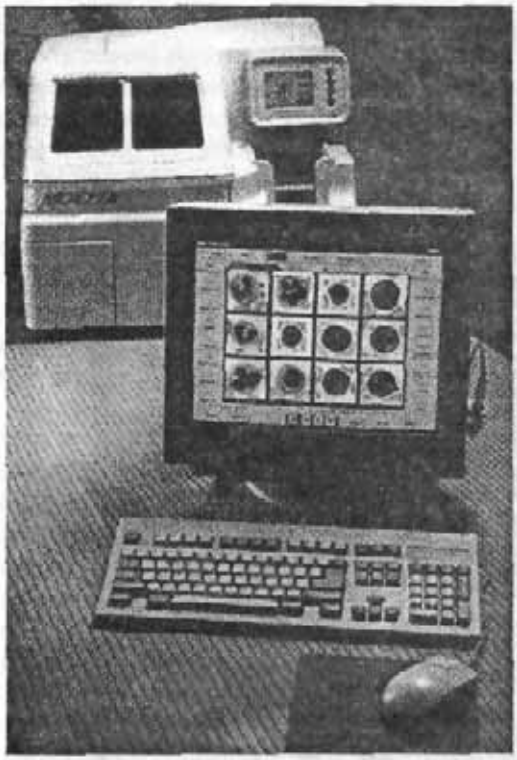


Рис. 77. Полностью автоматизированная система микроскопии с анализом изображений клеток крови MICRO 21 («Intelligent Medical Imaging, Inc.», США).

нове восприятия достижений научно-технического прогресса приобрела черты и возможности объективного метода изучения клеток. Однако, как и в других сферах медицинской деятельности, основой конструктивных и технологических новшеств в этой области стала творческая мысль, практический опыт и фактический материал наблюдений многих исследователей-микроскопистов. Банки компьютерных данных и программы их обработки и использования формируются людьми, использующими научные знания .

Проточная цитометрия

Если микроскопия послужила одним из первых в истории лабораторной медицины способов изучения клеток организма человека, то основанные на иных аналитических принципах (метод электрического импеданса, кондуктометрический метод Coulter) автоматические приборы для

Рис. 78. Система автоматического анализа изображений для флюоресцентной микроскопии Leica Q550FW Fluorescent Workstation, состоящая из флюоресцентного микроскопа, цифровой видеокамеры и компьютера со специальным программным обеспечением *Leica QFluoro и банком двумерных флюоресцентных* изображений (« Leica Microsystems Imaging Solutions Limited», Великобритания).

подсчета различных клеток в биоматериалах впервые появились в клинических лабораториях лишь в 60-х годах XX века.

Эффективный современный подход к решению проблем подсчета и дифференциации различных видов клеток крови состоит в применении **проточных автоматических гематологических цитометров.** Первое поколение этих приборов имело в качестве основного принципа измерения количества и размера клеток - кондуктометрический. Клетки крови проходят через микроотверстие капиллярной трубки диаметром порядка 100 мкм, по обе стороны которой расположены электроды сети постоянного электрического тока. Появление клетки в отверстии повышает сопротивление в электрической цепи, возникающий при этом импульс регистрируется прибором, число импульсов подсчитывается. Кроме того, амплитуда импульса отражает объем клетки, что дает возможность построить гистограмму распределения клеток по их объему и позволяет получить информацию о разновидностях клеток. Гистограмма распределения эритроцитов по их объему, выстраиваемая автоматическим анализатором (рис. 79), позволяет не только рассчитать *средний объем эритроцита* в фемтолитрах (литр x 10^{-15})на клетку (MCV) как медиану распределения эритроцитов, но и среднее квадратичное отклонение(или коэф-

Рис. 79. Гистограмма распределения эритроцитов по объему , полученная в автоматическом цитометре (по Hanson, 1994). По оси абсцисс - объем клеток в фемтолитрах, по оси ординат - число клеток. Медиана - средний объем клетки (MCV), коэффициент вариации или среднее квадратичное отклонение - ширина распределения (RDW).

фициент вариации) как эквивалент *разброса распределения эритроцитов* (RDW) По левую сторону от кривой распределения нормоцитов будут располагаться микроциты, большие тромбоциты, а макроциты и малые лимфоциты разместятся по правую сторону от кривой нормоцитов. Следует заметить, что при некоторых патологических состояниях значительные количественные изменения среди этих групп клеток могут вызывать неправильное измерение общего числа эритроцитов.

Сопоставление нескольких параметров эритроцитов позволяет автоматически рассчитать помимо и ранее применявшегося показателя *гематокрита* (выраженного в литрах на литр или в процентах производного от умножения среднего объема эритроцита в литрах на клетку на число эритроцитов в клетках на литр) некоторые индексы, ставшие стандартными показателями состояния красного ростка крови : *среднее содержание гемоглобина в эритроците*, т.е. отношение концентрации гемоглобина в г/л к числу эритроцитов в литре крови(МСН); *среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците*, т.е. отношение концентрации гемоглобина в г/л к величине гематокрита в литрах на литр (МСНС).

Современные цитометры наряду с кондуктометрическим методом, который первоначально использовался преимущественно в приборах фирм Coulter и Toa, могут быть оснащены устройствами для оценки рассеяния света лазера (англ. laser light - scattering), предложенными фирмой Technicon, что дает возможность строить скаттерограммы, т.е. диаграммы распределения клеток по их способности рассеивать свет луча лазера. Это позволяет более четко выделять различные группы клеточных элементов, отличающиеся не только по размеру, но и по зернистости.

Подсчет общего количества лейкоцитов и построение их гистограммы производится на основе такого же метода, что и при автоматическом исследовании числа эритроцитов, но после лизиса эритроцитов. На рис. 80 приведена гистограмма клеток крови, полученная с помощью анализатора STKS. Указаны пики лимфоцитов, моноцитов/эозинофилов, гранулоцитов, а также «флаги», т.е. сигналы прибора о наличии нетипичных клеток: R1 - наличие ядерных эритроцитов, сгустков тромбоцитов, больших тромбоцитов, криоглобулина, малых лимфоцитов, нелизированных эритроцитов; R2 - реактивные лимфоциты, лимфобласты, базофилы, свертки крови; R3 - эозинофилия, моноцитоз, бласты, свертки крови; R4 - гранулоцитоз. Подсчет числа лейкоцитов требует применения в качестве антикоагулянта этилендиаминтетрауксусной кислоты, поскольку гепарин может интерферировать с лизирующими клетки реагентами. При ЭДТУК-зависимой агглютинации тромбоцитов может быть использован цитрат.

Сочетание кондуктометрического принципа с применением радиочастотного анализа, рассеивания света лазера, дифференцирующих лизатов, специфического окрашивания клеток позволило расширить использование автоматических анализаторов для анализа различных клеточных элементов крови, в первую очередь для дифференциального подсчета лейкоцитов.

Автоматические гематологические анализаторы различных фирм оснащены разнообразными комбинациями указанных выше методов. Так, в анализаторах H6000, H1 и H2 фирмы «Technicon» используется проточная цитометрия в сочетании с миелопероксидазным цитохимическим окрашиванием и определением характеристик светорассеяния; в анализаторах STKS («Coulter») и NE8000 («TOA», «Sysmex») применяется комбинация электрического импеданса, низко-частотной проводимости и лазерного светорассеяния; в анализаторе Cell-Dyn 3000 («Abbott») используется сложный анализ светорассеяния под многими углами наблюдения; в анализаторе Cobas Argos 5 Diff («Roche») характеристика кле-

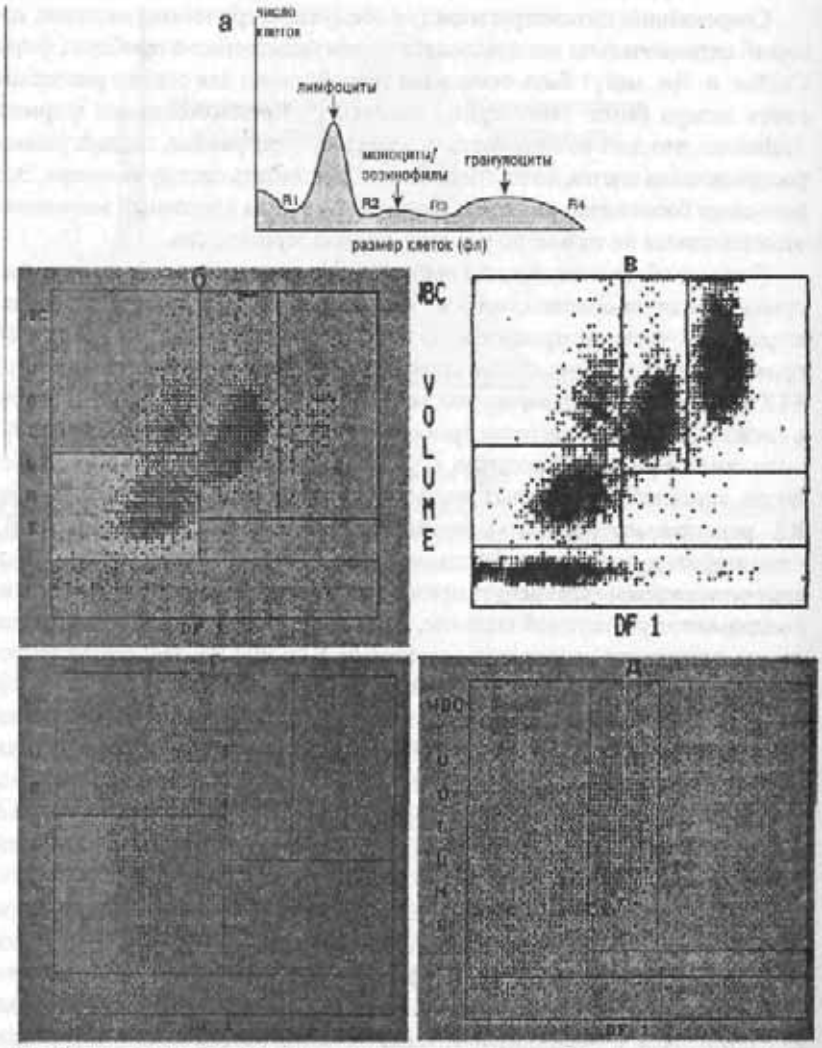


Рис. 80. Гистограммы распределения клеток крови по объему, полученные на гематологическом анализаторе Coulter STKS (Hanson, 1994). **а.** Пример графического представления распределения лейкоцитов. **б.** Скаттерограмма нормального соотношения лейкоцитов. **в.** Скаттерограмма при эозинофилии (52%). **г.** Скаттерограмма при хроническом лимфолейкозе. **д.** Скаттерограмма при остром миелолейкозе.

ток осуществляется на основе сочетания методов электрического импеданса, цитохимии и оптической абсорбции.

Автоматический гематологический анализатор SE-9000 («TOA Medical electronics», «Sysmex») (рис.81) на основе сочетания радиочастотного (рис.82а) и прямоточного методов (рис.82б) с применением специфичных к клеткам реагентов осуществляет раздельный подсчет различных видов лейкоцитов. Лимфоциты, моноциты и гранулоциты выявляются в форме трех зон на дифференциальной скаттерограмме (рис. 83а). Эозинофилы и базофилы определяются на отдельных каналах с применением специфических лизирующих реагентов. Число нейтрофилов вычисляется на основе результатов, указанных выше, и общего числа лейкоцитов, которое также подсчитывается на специальном канале с помощью прямоточного метода и автоматической дискриминации. Определение наличия и подсчет необычных клеток, в том числе миелобластов, промиелоцитов, метамиелоцитов, миелоцитов и др. осуществляется с помощью второй скаттерограммы, получаемой на дополнительном канале (рис.83б). Эритроциты и тромбоциты подсчитывают с применением прямоточного метода с гидродинамической фокусировкой (рис. 84), при этом также проводится измерение их размеров.

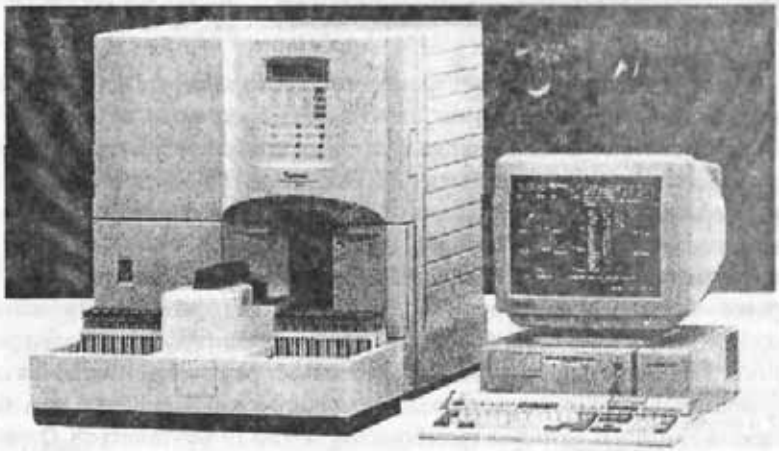


Рис. 81. Автоматический гематологический анализатор SE - 9000 («TOA Medical Electronics Co., Ltd», «Sysmex»)для определения до 23 гематологических параметров периферической крови со скоростью до 129 анализов в час.

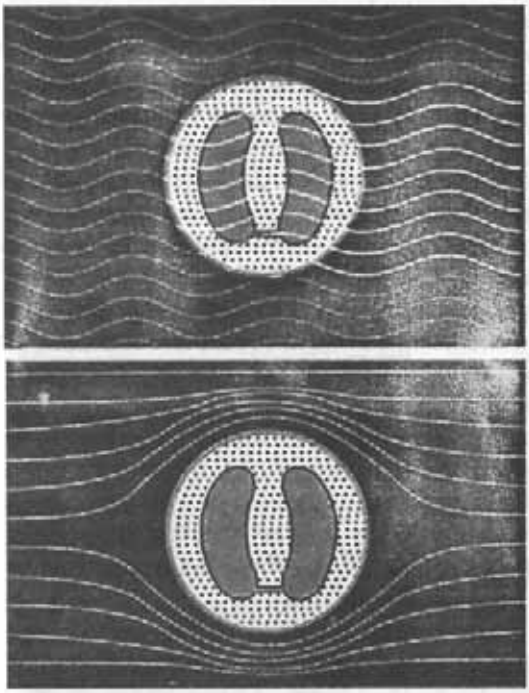


Рис. 82. Схематическое изображение принципов определения размеров клеток в автоматическом гематологическом анализаторе SE-9000:
а радиочастотный принцип,
б прямоточный принцип.

Как отмечено выше, подсчет тромбоцитов и составление гистограмм их распределения по размеру может включаться в программы автоматических гематологических анализаторов (предотвращение свертывания крови достигается чаще всего с помощью ЭДТУК, а при ЭДТУК-зависимой агглютинации тромбоцитов - с помощью цитрата). Гистограмма распределения тромбоцитов (рис. 85) обычно охватывает диапазон их размеров от 2 до 40 фемтолитров. Левее этой зоны могут находиться обломки клеток, а правее - большие тромбоциты, микроэритроциты. Указанный диапазон выделен искусственно для того, чтобы исключить интерференцию микроцитов. Затем компьютер прибора обрабатывает результаты измерения по log-нормальной кривой и экстраполирует кривую, чтобы охватить весь диапазон возможных размеров тромбоцитов от 0 до 70 фемтолитров. Ошибки автоматического определения числа тромбоцитов могут быть вызваны как сдвигом кривой их распределения влево за счет большого числа фрагментов эритроцитов и лейкоцитов, либо за счет сдвига кривой вправо вслед-

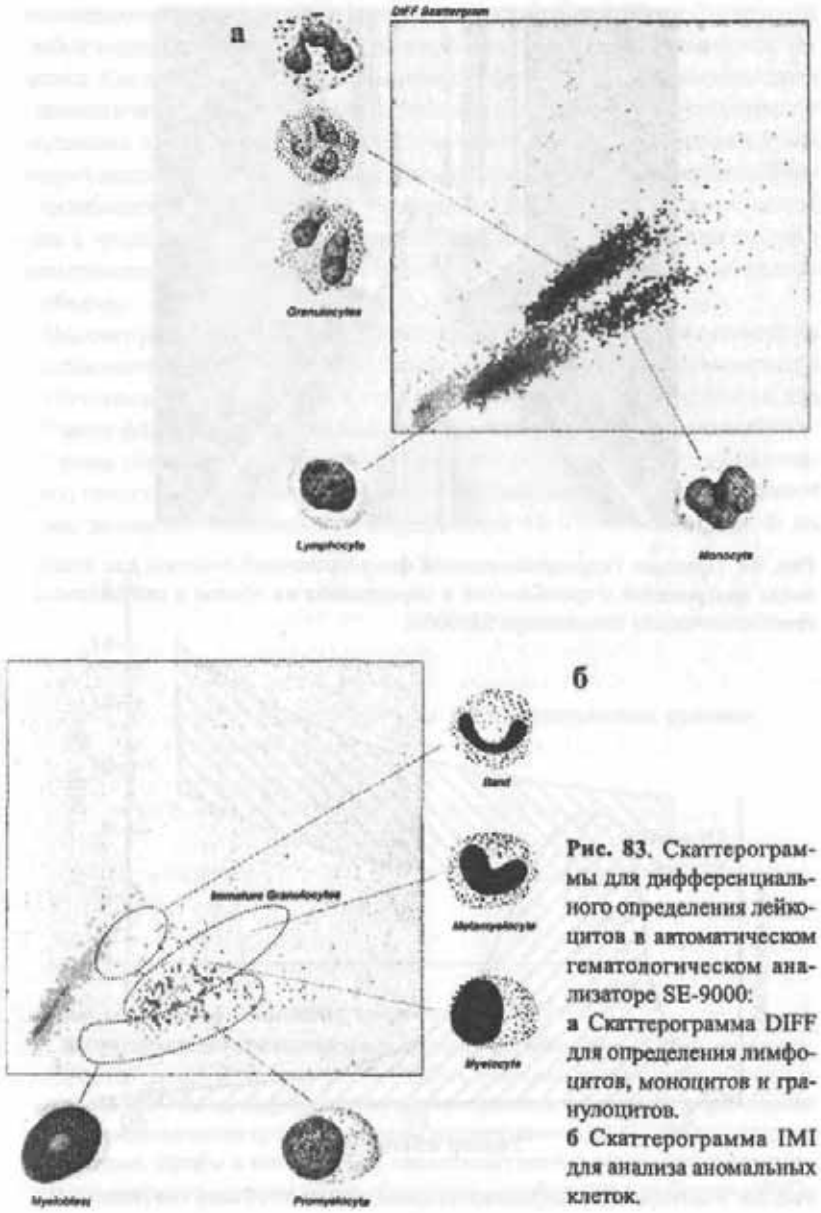


Рис. 83. Скаттерограммы для дифференциального определения лейкоцитов в автоматическом гематологическом анализаторе SE-9000:

а Скаттерограмма DIFF для определения лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов.

б Скаттерограмма IMI для анализа аномальных клеток.

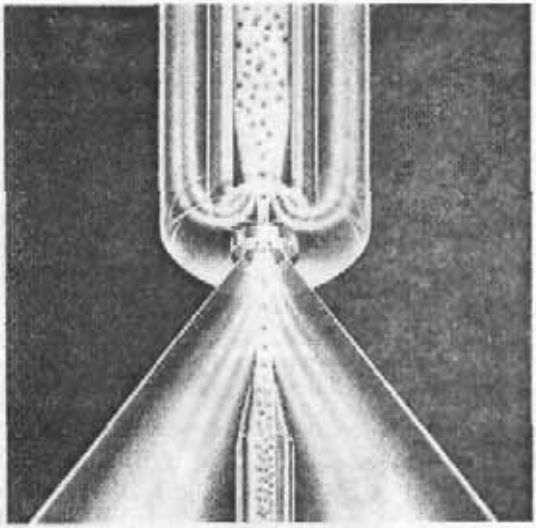


Рис. 84. Принцип гидродинамической фокусировочной системы для подсчета числа эритроцитов и тромбоцитов и определения их объема в автоматическом гематологическом анализаторе SE-9000.

Рис. 85. Гистограмма распределения тромбоцитов по объему (по Hanson, 1994).

ствие наличия микроцитов или гигантских тромбоцитов. Частой причиной ошибок подсчета тромбоцитов и ложной тромбоцитопении являются их сгустки. Как и в других случаях сомнения в правильности автоматического гематологического исследования, приходится прибегать к визуальным наблюдениям, в данной ситуации - к фазово-контрастной микроскопии. В некоторых автоматических цитометрах осуществляется расчет среднего объема тромбоцитов (MPV), который, как видно на рис. 86, находится в обратной связи с числом тромбоцитов. Возможные причины ошибок при расчете этого показателя те же, что и при подсчете и распределении тромбоцитов по объему.

Подсчет ретикулоцитов с помощью проточных цитометров основан на использовании флюоресцентных красителей, способных связываться с остаточным количеством РНК в этих клетках. Наиболее подходящими для этой цели флюорохромами являются аурамин О и тиазол оранжевый.

Таким образом, в современных больших гематологических анализаторах, сочетающих различные принципы исследований и оценки клеток крови, заложены возможности определения 18 - 24 показателей. В их

Рис. 86. Диаграмма расчета среднего объема тромбоцитов (MPV), величина которого находится в обратных отношениях с числом тромбоцитов. Пробы с величиной MPV выше нормального уровня отражают адекватное образование клеток в костном мозге при интенсивном их разрушении на периферии и тромбоцитопении. Пробы с низким MPV свидетельствуют о возможном торможении костного мозга и уменьшении образования трмбоцитов (по Hanson, 1994).

набор входят : число лейкоцитов, число эритроцитов, концентрация гемоглобина, число тромбоцитов и ретикулоцитов, такие расчетные показатели, касающиеся эритроцитов, тромбоцитов и ретикулоцитов, как показатель гематокрита, средний объем эритроцита, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, RDW, MPV, PDW, PCT и другие; абсолютное и в процентах число нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов, базофилов, больших неокрашенных клеток. По желанию пользователя могут быть встроены аналитические возможности для морфологических исследований лейкоцитов (оценка левого сдвига, атипичных лимфоцитов, бластных клеток, незрелых гранулоцитов, дефицита миелопероксидазы), эритроцитов (анизо-, микро-, макро-, гипо-, гиперформы, фрагменты эритроцитов и др.), тромбоцитов (большие тромбоциты и др.).

Дальнейшее развитие проточная цитометрия получила за счет сочетания трех аналитических принципов: одновременного применения оптических эффектов флюоресценции, переднего (FSC) и бокового светорассеяния (SSC); метода специфического связывания с использованием множества разнообразных моноклональных антител при возможном одновременном связывании нескольких моноклональных антител с различными антигенами одной и той же клетки для более точной ее антигенной характеристики (двойное, тройное, четырехточечное связывание); мечения моноклональных антител разнообразными флюорохромами, отличающимися своими флюоресцентными характеристиками (многоцветная флюориметрия) (таблица 22); использования разных источников света, в том

Таблица 22

Характеристика флюорохромов, применяемых при иммунофенотипировании

Флюорохромы	*Длины волн*		*Примечания*
	возбуждения	*испускания*	
Аллофикоцианин	633	660	Применяется при свете неоновой, гелиевой, криптоновой ламп и цветного лазера
Аминометилкумарин	350	450	Минимальное совпадение со спектрами других флюорохромов позволяет применять при двойном маркировании

Дуохром («Becton DickinsonImmunocytometry System, Inc.»)	492	620	Парный конъюгат PE и Texas Red
Индодикарбоцианин (Cy 5)	610	670/680	Применяется при свете ртутной и ксеноновой ламп, криптон / аргонового лазера
Индокарбоцианин (Cy 3)	550	570	Высокая интенсивность света
Карбоцианин (Cy 2)	490	508	Высокая светостабильность и интенсивность свечения
Родамина дериваты: LRSC	530	580/59	Применяются при двойной (лиссамин родамин сульфонилхлорид), маркировке с FITC
TRITC (тетраметилродамин), TRSC (Texas Red сульфонилхлорид)			
Фикоэритрин (PE)	492	580	Высокий квантовый выход
B - PE	488	580	Оптимальное свечение при ртутной лампе
R - PE	545/565	580	Оптимально с аргоновым лазером
Флюоресцеинтиоцианат (FITC)	485/492	530/520	Низкая молекулярная масса, стабилен
Texas Red	600	630	Применяется с цветным лазером

числе одновременного (например, двух лазеров). Вследствие этих своих свойств современные проточные цитофлюорометры значительно превосходят по своим аналитическим возможностям гематологические анализаторы, предназначенные для подсчета количества клеток, позволяя одновременно исследовать множество клеточных популяций в одной пробе с помощью нескольких методов и маркеров: измерение бокового светорассеяния позволяет характеризовать размеры клеток; измерение переднего светорассеяния отражает состояние цитоплазмы и мембран клеток; моноклональные антитела позволяют специфически соотнести оптические эф-

фекты с клетками, обладающими строго определенной антигенной структурой; параллельное измерение флюоресцентных сигналов определенных длин волн несколькими фотоумножителями дает возможность одновременной оценки нескольких антигенов. Кроме того, ряд моделей проточных цитофлюорометров оснащены устройствами для сортировки клеток по из заряду - сортерами. Принципиальная схема цитофлюорометра приведена на рис.87. На рис.88а изображен проточный цитометр BRYTE HS («BioRad»), а на рис.88б - его оптическая схема, состоящая из оптики темного поля, рассеяния света и флюорометрии.

Поскольку основные аналитические возможности проточного цитометра основаны на эффекте флюоресценции или рассеяния света, возникающем при пересечении потоком клеток или иных частиц стабильного луча света лазера или иного источника света, принципиально важно обеспечить точное совпадение места пересечения потока частиц и светового луча с точкой оптимального освещения частиц и направления света флюоресценции и рассеиваемого света на соответствующие детекторы, так как в противном случае результаты исследований будут искажены. Как и

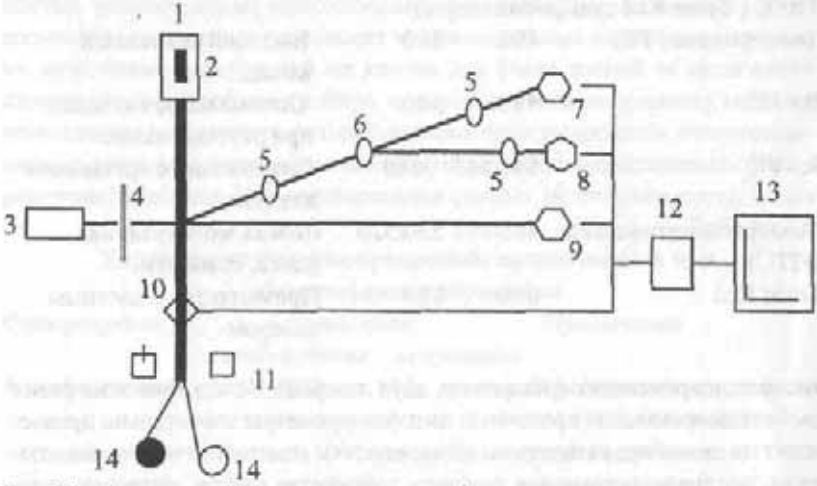


Рис. 87. Схема устройства проточного цитофлюорометра.

1. Проточная камера. **2.** Зона гидродинамического фокусирования. **3.** Источник света. **4.** Линзы. **5.** Светофильтры. **6.** Зеркала. **7.** Фотодетектор света флюоресценции. **8.** Фотодетектор бокового светорассеяния. **9.** Фотодетектор прямого светорассеяния. **10.** Пьезоэлектрический детектор. **11.** Сортер. **12.** Электронная система обработки данных. **13.** Дисплей. **14.** Резервуары для разделенных клеток.

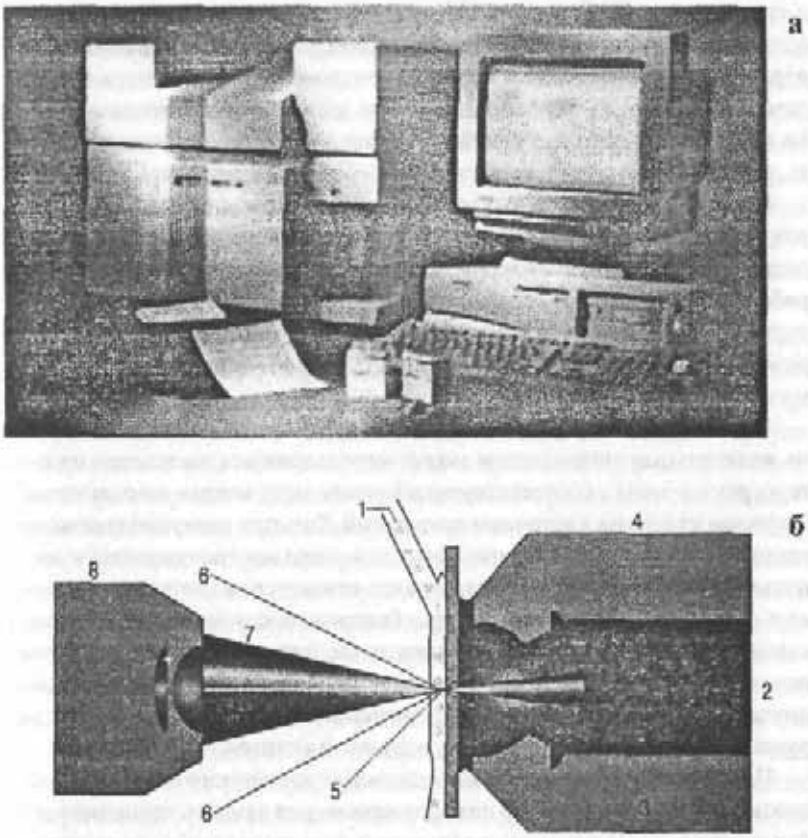


Рис. 88. Проточный цитофлюорометр BRYTE HS («Bio-Rad»), оснащенный ксеноновой или ксеноново-ртутной лампой, излучающей свет широкого диапазона, системой разнообразных светофильтров света возбуждения и испускания, что позволяет использовать разнообразные красители, с чувствительностью определения размера до < 0,3 мкм, с разрешением измерения размеров до < 20 нм, с фотоумножителями для прямого и бокового светорассеяния и 2-3 фотоумножителями для света флюоресценции :

а Вид проточного иммуноцитофлюорометра.

б Схема его оптической системы : 1. Клетки в потоке пробы. 2. Свет возбуждения. 3. Темное пятно. 4. Эпифлюоресцентный объектив. 5. Фокус. 6. Свет. 7. Темное поле. 8. Объектив рассеянного света.

в отношении других измерительных приборов, должна проводиться периодическая калибровка цитофлюорометров, для чего используются стандартные микрошарики или куриные эритроциты. Существенные отклонения в показаниях прибора могут быть вызваны отклонениями от точки пересечения потоком частиц луча света, ослаблением источника света, загрязнением оптической системы, сбоями в энергоснабжении и т.д.

Поскольку в современных методиках часто применяется множественная маркировка различными флуорохромами с взаимонакладывающимися спектрами эмиссии, должна производиться предварительная юстировка рабочих спектров флюоресценции путем использования комплектов стандартных микрошариков с соответствующими флуорохромами и электронной компенсации для исключения сигналов, мешающих раздельному определению антигенов.

При настройке проточного цитофлюорометра на исследование только желательных типов клеток может использоваться выделение на скаттерограмме зоны , соответствующей этому типу клеток с исключением сигналов от других клеточных популяций. Так, при иммунофенотипировании лимфоцитов из анализа могут исключаться гранулоциты и моноциты. Другим способом может служить исключение клеток, не помеченных определенным клоном антител (например, с помощью CD45, свойственного лейкоцитам). Предварительное лизирование эритроцитов с помощью хлорида аммония позволяет проводить исследование лейкоцитов более быстро, однако предварительно следует убедиться, не разрушает ли лизирующий агент исследуемый антиген.

Плодотворной теоретической основой современного подхода к исследованию клеток с помощью цитофлюорометров явилась концепция дифференцировочных клеточных антигенов (кластеров дифференцировки , CD антигенов), представляющих собой функционально значимые для клеток поверхностные молекулы: рецепторы, домены и детерминанты. В настоящее время список CD-антигенов насчитывает 166 наименований, которые можно подразделить на 20 семейств и групп гликопротеинов, 1 группу гликосфинголипидов и 1 группу олигосахаридов. Выяснилось, что дифференцировочные антигены могут быть соотнесены с примерно 80 типами клеток, т.е. не только с лейкоцитами крови, но и с эритроцитами, тромбоцитами, клетками костного мозга, тимуса, эндотелиальными клетками.

С помощью моноклональных антител, меченых флуорохромами, стало возможным определение и фенотипирование Т-клеток, В-клеток, Т-

клеточных рецепторов, макрофагов и гранулоцитов, естественных киллеров, молекул клеточной адгезии, антигенов главного комплекса гистосовместимости, активационных антигенов, антигенов клеточного цикла, маркеров апоптоза, цитокинов. Так, для зрелых Т-лимфоцитов наиболее характерным антигеном служит CD3; для Т-хелперов/индукторов значимо определение CD4; CD8 свойственен Т-супрессорам; В-лимфоциты обладают набором антигенов CD19, CD20, CD22; натуральные киллеры (NK) характеризуются антигенами CD16, CD56, CD57; CD25, CD71, HLA-DR являются маркерами ранней активации; CD11, CD18, CD54, CD59 отражают адгезивные молекулы.

Существование обширной палитры флюорохромов с разнообразной интенсивностью свечения позволяет компенсировать слабую экспрессию отдельных антигенов и достаточно уверенно их определять. Как и при иммуноцитохимических исследованиях, мечение антител для иммунофлюороцитометрии можно осуществлять прямым и непрямым методом. При втором варианте окраски первоначально происходит связывание с искомым антигеном биотинилированного антитела, а затем с помощью конъюгированного с флюорохромом авидина осуществляется выявление комплекса антиген-антитело. Практика мечения множественными антителами показала предпочтительность прямого иммунофлюоресцентного метода перед сендвич-методом в связи с тем, что в настоящее время в большинстве наборов используются мышиные антитела, которые проявляют широкую перекрестную реактивность при многих непрямых технологиях. На результаты фенотипирования могут оказать влияние такие преаналитические факторы, как использованный при взятии образца периферической крови антикоагулянт, время дня при взятии образца, содержание образца перед анализом не при комнатной температуре и т.д.

Процедура окрашивания образцов периферической крови с применением моноклональных антител к поверхностным антигенам состоит в следующем. Клетки промываются в забуференном фосфатом солевом растворе, иногда содержащем небольшую долю сыворотки для предупреждения неспецифического связывания моноклональных антител, затем клетки инкубируются в течение 30 мин. при 4°С с конъюгатом антител с флюорохромом в присутствии азида натрия. Для множественного маркирования различные антитела инкубируются одновременно, чтобы клетки окрашивались параллельно всеми красителями. Параллельно пробирка с клетками окрашивается изотипичными антителами для оценки степени неспецифического связывания антител с клетками. После инку-

бации клетки промывают и фиксируют параформальдегидом, что одновременно инактивирует вирус иммунодефицита, если он содержался в образце биоматериала. Приготовленные таким образом клетки могут сохранять окраску и свойства рассеяния света в течение 10-12 дней при содержании в темноте при 4°С.

При исследовании поверхностных маркеров тромбоцитов прибегают к предварительной фиксации параформальдегидом перед окрашиванием для уменьшения влияния возможных артефактов. Прямая или непрямая иммунофлюресцентная техника может быть использована для установления наличия аутоантител против лимфоцитов, нейтрофилов или тромбоцитов пациента : первая из них - для детекции аутоантител, связанных in vivo с клетками, вторая - для детекции циркулирующих аутоантител.

Для окрашивания остаточной РНК в ретикулоцитах используют пиронин Y, акридин оранжевый, тиофлавин Т или тиазол оранжевый. Последний возбуждается светом с длиной волны 488 нм, эмитирует свет с длиной волны 533 нм.

Проточное иммунофлюориметрическое исследование поверхностных антигенов в клетках солидных опухолей затруднено, поскольку при получении монодисперсной суспензии таких клеток они подвергаются интенсивным механическим и ферментативным воздействиям, что существенно нарушает структуру их мембран. Поэтому в отношении клеток опухолей проточная цитофлюорометрия используется для исследования содержания ДНК. Этот анализ в клинических лабораториях осуществляется преимущественно с помощью флюорохрома пропидиум йодид, который сочетается с ДНК клетки и дает при возбуждающем свете с длиной волны 488 нм отчетливый флюоресцентный сигнал в оранжево-красном диапазоне, пропорционально содержанию ДНК. Окраска пропидиум йодидом позволяет определить плоидность образца и оценить пролиферацию клеток, поскольку содержание ДНК увеличивается при прохождении через S-фазу и переходе в фазу G2/M. На этой основе ДНК-цитометрия применяется для анализа клеточного цикла с распределением популяции клеток по фазам цикла. В свежеполученных анапластических образцах может быть определена скорость пролиферации клеток in vivo. Вариант исследования со стимуляцией препарата in vitro позволяет оценить как способность клеток к пролиферации, так и иммунодефицит (в случае совместного культивирования препарата лимфоцитов периферической крови с митогеном по сравнению с клетками без митогена или с препаратом заведомо нормальных лимфоцитов с митогеном).

Результаты аналогичных исследований замороженных фиксированных и покрытых парафином препаратов тканей в значительной мере зависят от качества их фиксации нейтрально-забуференным формалином, от размера срезов (оптимально 50 мкм). Срезы депарафинируются ксиленом, регидратируются в серии растворов этанола понижающейся концентрации, обрабатываются пепсином или трипсином и фильтруются до получения моноклеточной суспензии, которая окрашивается пропидиум йодидом, подобно препарату из свежей ткани.

Определенные дополнительные диагностические преимущества предоставляет одновременное определение поверхностных, внутриклеточных антигенов и ДНК. Это достигается последовательным определением первоначально поверхностных антигенов обычным способом с окрашиванием FITC, после чего клетки фиксируются слабым раствором параформальдегида и делаются более проницаемыми с помощью 70% метанола, затем они окрашиваются другим флоорохромом (аллофикоцианин, дуохром) для выявления внутриклеточных антигенов и ,наконец, обрабатываются раствором РНКаза / пропидиум йодид для окрашивания ДНК.

Значительный интерес в качестве перспективного объекта клинических исследований представляет определение внутриклеточных цитокинов и способности клеток к их выработке. Одним из вариантов такого исследования является проточная цитофлюорометрия с применением нескольких комбинаций моноклональных антител против поверхностных антигенов и внутриклеточных цитокинов с четырехцветным окрашиванием после стимулирования клеток in vitro эфиром форбола и иономицином в условиях блокирования монезином выхода вновь синтезированных цитокинов из клетки. Использованные в этом варианте исследования комбинации антител с четырьмя различными флюорохромами приведены на таблице 23.

Интерпретация результатов иммуноцитофлюорометрии производится по

Таблица 23

Четырехцветная комбинация антител против поверхностных антигенов и внутриклеточных цитокинов

1. FITC	*2. PE*	*3. ECD*	*4. PeCy5*
Анти-IFN	Анти-CD28	Анти-CD8	Анти-CD3
Анти-TNF	Анти -CD56	Анти -CD8	Анти -CD3
Анти -CD14	Анти -L12	Анти -CD3	Анти -HLA-DR

Исследование было проведено на проточном цитофлюорометре EPICS-MCL («Coulter») с одним лазером (Farrant, Lane, 1999).

гистограммам, графикам или цифровым отчетам. На гистограммах может быть отражено различное число параметров. Основным является однопараметрическая гистограмма, на которой сопоставляется интенсивность сигналов с их частотой, хотя возможно построение двупараметрических дисплеев и даже трипараметрических или многоцветных изображений результатов при многопараметрическом анализе. Надежность интерпретации результатов повышается с применением парного изотипического контроля. Положительное окрашивание изотипического контроля указывает на высокую степень неспецифического связывания или связывание с Fc-рецептором. В клинических лабораториях используется также контроль по параллельному фенотипированию заведомо нормальных образцов, приготовленных аналогично процедуре обработки образцов пациентов.

Представление результата фенотипирования клеток только в виде процента клеток, позитивных по отношению к определенному маркеру, в ряде случаев недостаточно, так как анализ патологического состояния может требовать определения абсолютного числа клеток данного типа, например, в случаях лимфопении, иммунодефицита.

Уже один перечень клеточных типов, которые могут быть точно дифференцированы и оценены с помощью описанных выше методов, дает представление об их диагностическом потенциале. Большое диагностическое значение для онкогематологии приобрело установление точной CD-антигенной характеристики гематопоэтических клеток на всех этапах их созревания (рис. 89). Сейчас это служит одним из практически применяемых способов диагностики острых лейкозов и лимфом, мониторинга их течения и оценки успешности лечения. Минимальная резидуальная болезнь также теперь более точно диагностируется и прослеживается. Для клинической иммунологии проточная иммуноцитофлюорометрия стала способом текущего иммунологического мониторинга с относительной (в процентах от общего числа лимфоцитов) и абсолютной (в числе клеток на микролитр крови) дифференциальной оценкой субпопуляций (подклассов) Т-клеток.

Проточная иммуноцитофлюорометрия может служить примером того, как рациональное сочетание физических (оптические эффекты, пневматика, гидравлика, электроника), химических (флюорохромы), биологических (моноклональные антитела, CD - антигены, нуклеиновые кислоты, митагены) и информационных подходов (компьютеризация) подходов в современных лабораторных технологиях придает им высокие аналитические и диагностические свойства.

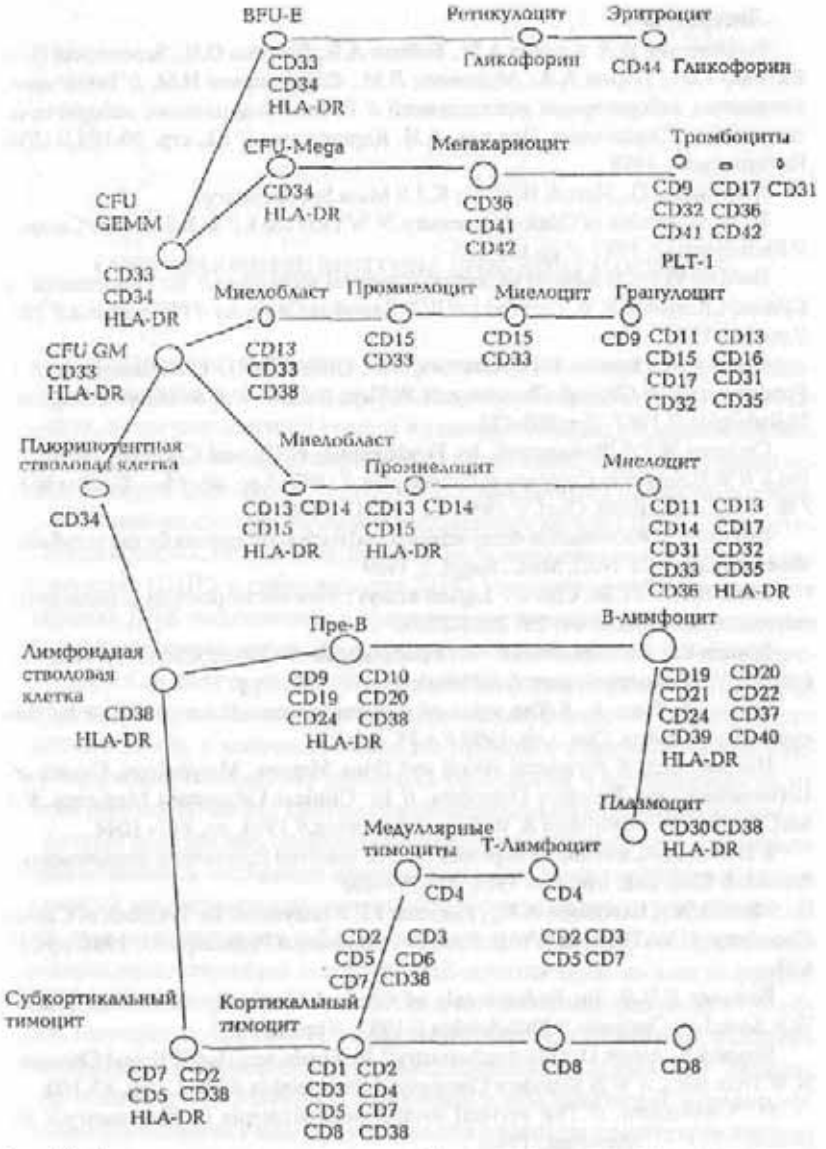


Рис. 89. Схема экспрессии антигенов дифференцировки в процессе созревания гематопоэтических клеток.

Литература

Войхонский В.Л. Алинов А.Н., Бойцов А.Б., Егорова О.В., Запольская Н.М., Литовка О.Н., Порин А.А., Муравник Л.М., Сафьянников Н.М. // Техническое оснащение лабораторных исследований // В кн.: Медицинские лабораторные технологии. Справочник. Под ред. А.И. Карпищенко // Т.1, стр. 30-125.// СПБ., Интермедика. 1998

Andresen B.D., Hurtuk B.W, Ng K.J.// Mass Spectrometry//

In: Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.). // W.B.Saunders Company // Philadelphia.// 1987. // pp.137-143

Buffone G.J.// Principles of immunochemical techniques.// In: Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.). // W.B.Saunders Company // Philadelphia.// 1987. // pp.144-159.

Burtis C.A., Bowers L.D., Chattoraj S.c., Ullman M.D.//Chromatography.// In: Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.). // W.B.Saunders Company // Philadelphia.// 1987. //pp.105-123

Caraway W.T.// Photometry// In: Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.). // W.B.Saunders Company // Philadelphia.// 1987. // pp. 46- 65. Coulter W.H. / / In : Proc. Natl. Elect. Conf. // 1956, 12 : 1034 - 1040.

Dillman L.T. Radionuclide decay schemes and nuclear parameters for use in radiation-dose estimation.// J. Nucl. Med. , Suppl. 2, 1969.

Ekins R.P. // //Clin. Chem.// Ligand assays : from electrophoresis to miniaturized microarrays.// 1998. v. 44, PP. 2015-2030..

Epstein E.// Electophoresis.// In: Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.). // W.B.Saunders Company // Philadelphia.// 1987. // pp. 77-86.

Farrant J., Lane A. // The value of measuring intracellular cytokines by flow cytometry. // Europ. Clin. Lab. 1999.// v.18, 2, p.12.

Hanson C.A. // Peripheral Blood and Bone Marrow: Morphology, Counts and Differentials, and Reactive Disorders. // In: Clinical Laboratory Medicine. K.D McClatchey (ed.)//Williams & Wilkins.// Baltimore.// 1994. pp. 817- 1044

J. Hemmila // Lanthanides as probes for time-resolved fluorometric immunoassays./ /Scand. J. Clin. Lab. Invest. // 1988, 48: 389-400

Moss D.W., , Henderson A.R., , Kachmar J.E.// Enzymes// In: Textbook of Clinical Chemistry. N.W. Tietz (ed.)/W.B. Saunders Company.// Philadelphia.// 1986. pp 619-699.

Powsner E.R.// In: Fudamentals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.). // W.B.Saunders Company // Philadelphia.// 1987. // pp. 124-137.

Siggard-Andersen O.// Electrochemistry// In: Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.). // W.B.Saunders Company // Philadelphia.// 1987. //pp. 87-100

O. Suovaniemi. // The vertical measerment principle in photometry.// Int. [illegible] May-June, 1984.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДНК-ДИАГНОСТИКИ

Конец второго тысячелетия ознаменовался созданием революционных технологий в различных сферах человеческой деятельности и, в частности, в биотехнологии и генной инженерии. Наряду с возникновением принципиально новых направлений в медицине, таких как генная терапия и генная фармакология, успешно применяются в практике современной клинико-диагностической лаборатории методы ДНК-диагностики, среди которых, безусловно, первое место занимают полимеразная цепная реакция (ПЦР) и гибридизация ДНК. Уже сейчас после первых лет внедрения ДНК-диагностики в практическое здравоохранение ясно, что в ближайшее время произойдет внедрение новых систем - биологических чипов. Следует признать, что уровень информированности научных сотрудников и медицинских работников сильно отстает от современного состояния дел и, в конечном итоге, это приводит к формированию причин, по которым внедрение новейших технологий и создаваемых на их основе диагностических систем становится весьма затруднительным.

Авторы постарались описать основные методические приемы, активно развивающиеся в настоящее время и уже нашедшие свое применение в различных коммерчески реализуемых наборах реагентов и приборах. В то же время мы отдавали себе отчет в том, что осветить все возможные варианты существующих методов ДНК-диагностики весьма затруднительно вследствие их большого числа и интенсивного развития этой области технологии. Сейчас без преувеличения можно сказать: развитие "технологии манипулирования с наследственной информацией" сравнимо по темпам роста с микроэлектроникой и информатикой, нередко эффективно сочетается с ними. При этом для российского читателя эта технология, по-видимому, в основном ассоциируется с полимеразной цепной реакцией (ПЦР). В силу вышесказанного мы стремились, как можно

шире представить информацию по альтернативным или дополнительным к ПЦР методам. Для удобства в тексте представлены ссылки на серверы в ***ИНТЕРНЕТЕ***, где любознательный читатель сможет найти более полную информацию о методах, устройствах и приборах.

Первые сообщения о применении ДНК-диагностики, а именно гибридизации нуклеиновых кислот со специфическими зондами, появились в середине 70-х годов. Эти методы быстро вошли в практику диагностической лабораторной службы многих стран. Вместе с тем, на первых этапах широкое применение ДНК-диагностики сдерживалось необходимостью использовать в работе фенол и другие токсические органические соединения, а также радиоактивные изотопы для детекции результатов анализа. В значительной степени эти трудности были преодолены к началу 80-х годов, когда на рынке диагностических средств появились тест-системы, в которых использовались методы нерадиоактивной детекции результатов и пробоподготовка, не требующая применения токсических органических соединений. До настоящего времени многие ведущие биотехнологические компании производят наборы реагентов для проведения гибридизации для выявления инфекционных агентов вирусной и бактериальной природы.

Принцип метода полимеразной цепной реакции был разработан Кэри Мюллисом в 1983 г (http://www.pebio.com). Первые сообщения по практическому применению метода появились в 1985 г. С тех пор количество публикаций, где ПЦР используется в качестве одного из методов исследования, занимает одно из первых мест наряду с работами, в которых применяются автоматическое определение нуклеотидной последовательности (сиквенирование ДНК) и гибридизационные технологии.

В настоящее время ПЦР является далеко не единственным методом в перечне амплификационных технологий, и уже сейчас необходимо обратить внимание на применение в практической лабораторной диагностике лигазной цепной реакции (*LCR*) (http://www.abbotdiagnostics.com) (рис. 1), амплификации со сдвигом цепи (*SDA*) (http://www.bdms.com/newtech/sda) (рис.2), амплификации с использованием транскрипции – (*NASBA, 3SR* и т.д.) (http://www.organonteknika.com) (рис.3). Помимо этих методов, используемых для амплификации (многократного умножения) матрицы, необходимо выделить методы, суть которых состоит в амплификации сигнала. Речь идет о различных модификациях метода гибридизации нуклеиновых кислот, при которых используются специфичные зонды, конъюгированные с субстратом или ферментом. В результате проис-

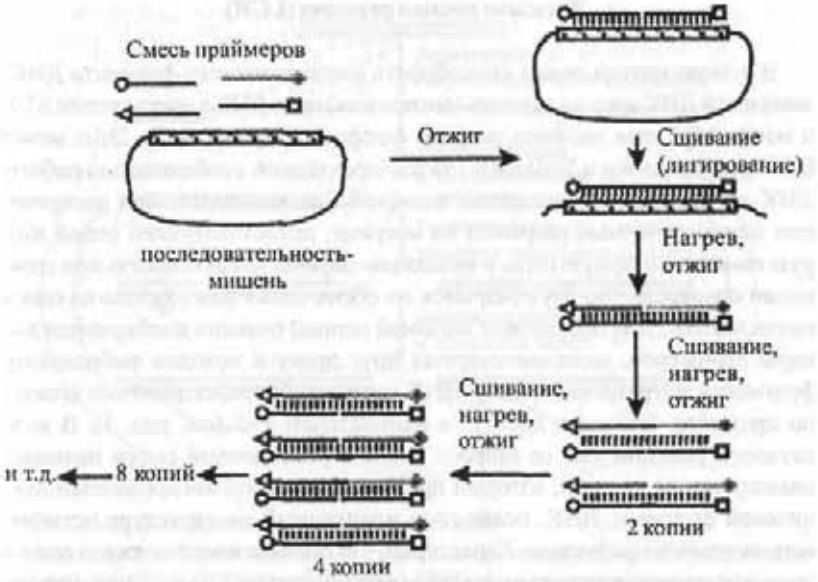


Рис. 1. Схема лигазной цепной реакции
ДНК-лигаза осуществляет лигирование (сшивку) праймеров, отожженных на денатурированной матрице по принципу "голова-к-хвосту" (5'--3'). Следующий цикл амплификации приводит к отжигу на лигированной первой паре праймеров второй пары по тому же принципу в обратном направлении. Проведенная реакция приводит к накоплению двухнитевых фрагментов, состоящих их четырех праймеров, лигированных попарно и комплементарных друг другу.

ходит многократное усиление образующегося сигнала, регистрируемого тем или иным способом в ходе определения. К числу таких методик следует отнести метод "разветвленной" ДНК (bDNA), основанный на гибридизации исходной матрицы с разветвленной пробой, содержащей несколько реакционно-способных групп, участвующих в процессе детекции (рис.4). Кроме того, перспективным представляется использование принципа иммунологического захвата гибрида ДНК/РНК с последующей иммунохимической детекцией (рис.5). Этот метод нашел свое применение в наборах фирмы Digene (www.digene.com) и широко используется для скрининга некоторых инфекционных агентов таких, как вирус папилломы человека, хламидия, цитомегаловирус.

Рассмотрим кратко основные принципы методов, перечисленных выше.

Лигазная цепная реакция (LCR)

В основе метода лежит способность специфического фермента ДНК-зависимой ДНК-лигазы сшивать (лигировать) цепь ДНК в присутствии АТФ и ионов Mg^{2+} при наличии разрыва фосфодиэфирной связи. Этот метод был предложен Wu и Wallace в 1989г. Характерной особенностью работы ДНК-лигазы является высокая специфическая активность при лигировании одноцепочечных разрывов на матрице, представляющей собой вторую комплементарную цепь, и низкая специфическая активность при сшивании одновременно двух разрывов на обеих цепях или разрыва на однонитевой ДНК. Для постановки лигазной цепной реакции подбираются две пары праймеров, комплементарных друг другу и исходно выбранному фрагменту матрицы (например, ДНК какого-либо инфекционного агента) по принципу "голова к хвосту" в направлении 5'-3' (см. рис. 1). В ходе лигазной реакции уже со второго цикла в реакционной смеси начинает накапливаться продукт, который представляет собой лигированный двунитевой фрагмент ДНК, полностью идентичный по структуре четырем используемым праймерам. Характерно, что ошибка в месте отжига даже в один нуклеотид приводит к негативным результатам. Эта реакция широко используется для детекции Chlamydia trachomatis, Mycobacterium tuberculosis и некоторых других ДНК-содержащих инфекционных агентов; существуют коммерческие наборы, выпускаемые фирмой Abbot.

Амплификация с вытеснением цепи (SDA)

Метод использует свойство ДНК- полимеразы, лишенной экзонуклеазной активности синтезировать новую цепь ДНК, вытесняя рестрицированную цепь (рис.2). Предварительно в ходе инициирования реакции с использованием специальных затравок создается сайт рестрикции для эндонуклеазы HincII. Поскольку в качестве предшественников в синтезе используются тиопроизводные аденозина гидролиз рестриктазой Hinc II приводит к образованию насечки (гидролизуется одна цепь), в то время как вторая цепь остается нативной. SDA относится к классу изотермических реакций. Изотермические методы в отличие от ПЦР и ЛЦР позволяют отказаться от сложной и дорогостоящей аппаратуры и использовать в качестве инкубаторов лабораторные термостаты. Этот метод амплификации позволяет получить до 10^6-10^7 копий на одну используемую матрицу. Существующие публикации сообщают, в основном, об успешном примене-

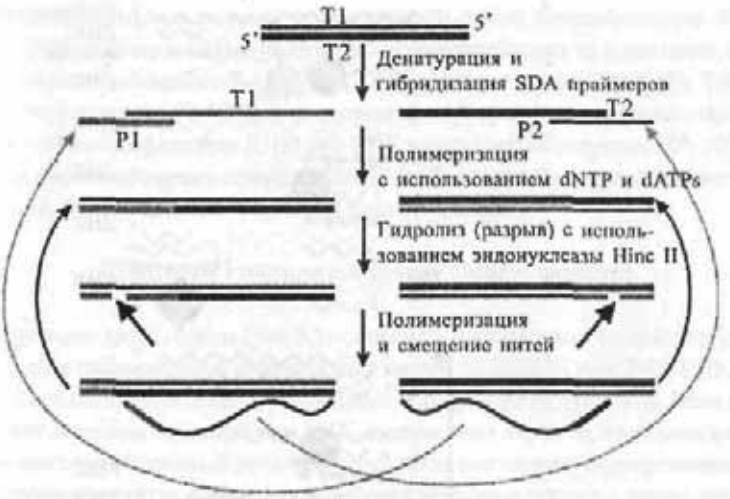


Рис. 2. *Схема амплификации с вытеснением цепи*
В присутствии избытка праймеров P1 и P2, содержащих сайт рестрикции для эндонуклеазы Hinc II, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I достраивает новые цепи. Далее, после гидролиза одной из цепей в сайте, указанном стрелками, следует синтез новых цепей со смещением (вытеснение одной из вновь синтезированных в предыдущих циклах цепей).

нии этого метода для детекции микобактерий туберкулеза. Метод пригоден для амплификации коротких фрагментов ДНК (40-150н.п.).

Реакции транскрипционно опосредованной амплификации (NASBA, TAS, 3SR)

Принципы всех этих изотермических реакций амплификации схожи и отличаются незначительными техническими деталями (рис.3), поэтому мы ограничимся рассмотрением наиболее широко применяемой в настоящее время технологии – NASBA. Первые сообщения об этом методе были сделаны группой авторов Kwoh et al. в 1989г.

В ходе реакции транскрипционно опосредованной амплификации происходит увеличение количества РНК (стадия 8 на рис.3), транскрибируемой со специального промотора (используется промотор для Т7-полимеразы), входящего в состав специфического праймера (стадия 1), который отжигается в определенном месте РНК- (и или ДНК) мишени. Если в

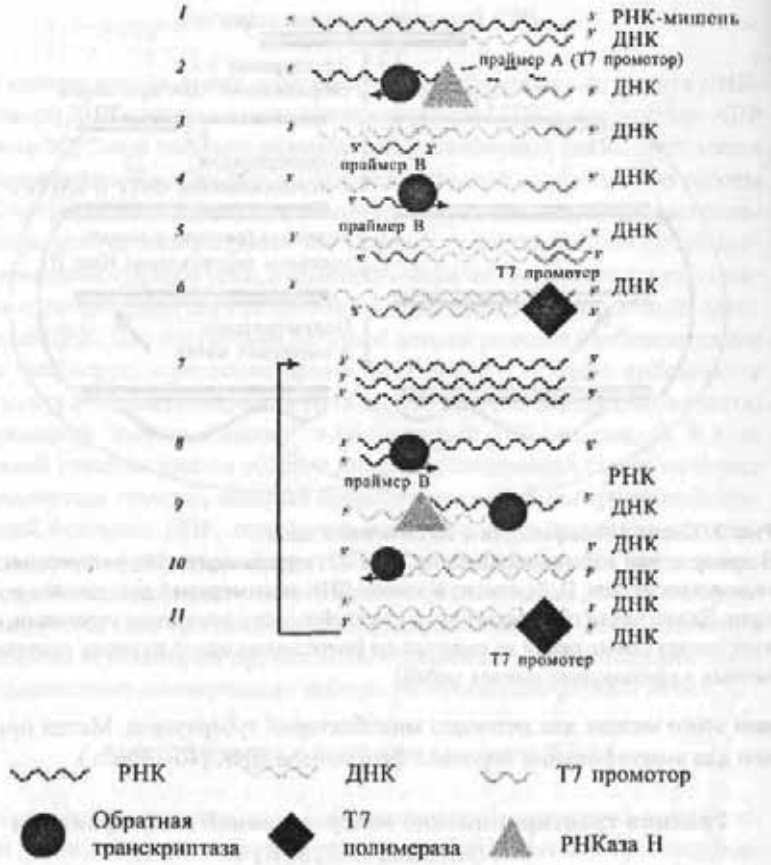


Рис. 3. Схема амплификации с использованием транскрипции NASBA

случае первичной мишени используется РНК-матрица, то первые стадии процесса, показанного на рис. 3, формируют полноценную структуру промотора ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага Т7 для инициирования транскрипции. Для достраивания второй цепи ДНК после первого этапа-обратной транскрипции (стадия 2) также используется фермент РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза) (стадии 4-6), обладающая также и активностью РНКазы Н. Эта активность удаляет матричную РНК после синтеза первой цепи ДНК (2) и, следовательно, делает процесс "денатурации" ДНК-РНК гибрида (за счет гидролиза РНК) автоматически

воспроизводимым в каждом последующем цикле амплификации. Фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза транскрибирует за один цикл, время которого составляет 5-15 мин., 10^5копий фрагментов РНК (7). Таким образом в течение 40-50 мин изотермической транскрипционно опосредованной амплификации ДНК или РНК в растворе образуется 10^8-10^9 копий. В настоящее время принцип NASBA используется в диагностических наборах, производимых фирмой Organon Technika.

ДНК/РНК гибридный захват (hibrid capture)

Принцип этого метода (рис 5.) основан на иммунохимической детекции продуктов гибридизации нуклеиновых кислот РНК/ДНК или ДНК/РНК моноклональными антителами, узнающими образующиеся дуплексы. Если происходит детекция бактерий или ДНК-содержащих вирусов, то используется рибоолигонуклеотидный зонд. В случае, когда выявлению подвергаются инфекционные агенты, содержащие рибонуклеиновые кислоты, такие, например, как вирус гепатита С, используют дезоксирибонуклеиновый зонд. В современных наборах реагентов применяется хемилюминесценция, в качестве процесса, обеспечивающего чувствительную детекцию результатов гибридизации. Преимущество этого подхода заключается в том, что практически сведены к минимуму подготовка клинического материала и очистка нуклеиновых кислот, что позволяет использовать иммунохимическую детекцию специфического РНК/ДНК гибрида для скрининга.

Метод гибридизации с использованием разветвленных зондов (bDNA)

Метод гибридизации с использованием разветвленных зондов (рис 4.) представляет собой пример амплификационных технологий, позволяющих усиливать сигнал в ходе определения . В результате многоступенчатого процесса гибридизации, (рис.4.) происходит присоединение многочисленных зондов, коньюгированных с молекулами фермента, окисляющего специальный субстрат и запускающий таким образом хемилюминесценцию.

Из всех перечисленных в данном разделе методик наиболее часто применяется полимеразная цепная реакция (ПЦР). Далее мы подробно остановимся на рассмотрении принципа метода, его преимуществах и недостатках, возможных модификациях.

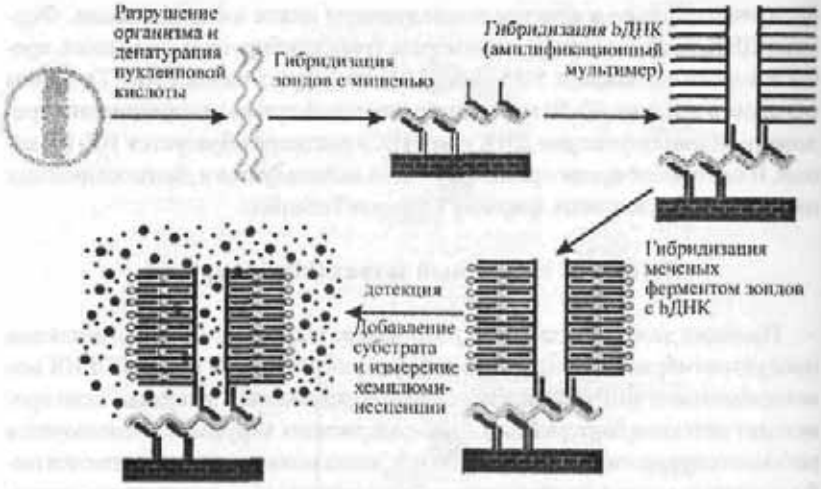


Рис. 4. Амплификация сигнала (bДНК)
Специальный зонд после гибридизации с определяемым фрагментом ДНК/РНК гибридизуется с разветвленным зондом (bДНК), содержащим несколько реакционно-способных частиц, участвующих в детекции (хемилюминесценция).

Рис. 5. ДНК-РНК гибридный захват (DNA-capture)
Использованный в качестве зонда фрагмент РНК гибридизуется с однонитевым фрагментом ДНК. Антитела, узнающие гибридную молекулуДНК-РНК, конъюгированы с ферментом, участвующим в иммунохимической детекции.

Полимеразная цепная реакция

В настоящее время ПЦР широко используется как для научных исследований, так и для диагностики в практическом здравоохранении и службе Госсанэпиднадзора (генотипирование, диагностика инфекционных заболеваний, определение устойчивости к химиопрепаратам). Ос-

новные производители наборов реагентов для ПЦР, используемых в России, «Рош Диагностикс», НПФ «Литех», «ДНК - технология».

В основе метода ПЦР (рис.6) лежит комплементарное достраивание ДНК-матрицы, осуществляемое in vitro с помощью фермента ДНК-зависимой ДНК-полимеразы.

Открытие термостабильной ДНК-зависимой ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы) из термофильных бактерий *Thermus aquaticus*, оптимум работы которой находится в области 70-72°С, позволило автоматизировать процесс синтеза ДНК in vitro, так как фермент-катализатор реакции не инактивировался при денатурации ДНК нагреванием. Прогревание Taq-полимеразы в течение 40 мин при температуре 95°С снижает активность

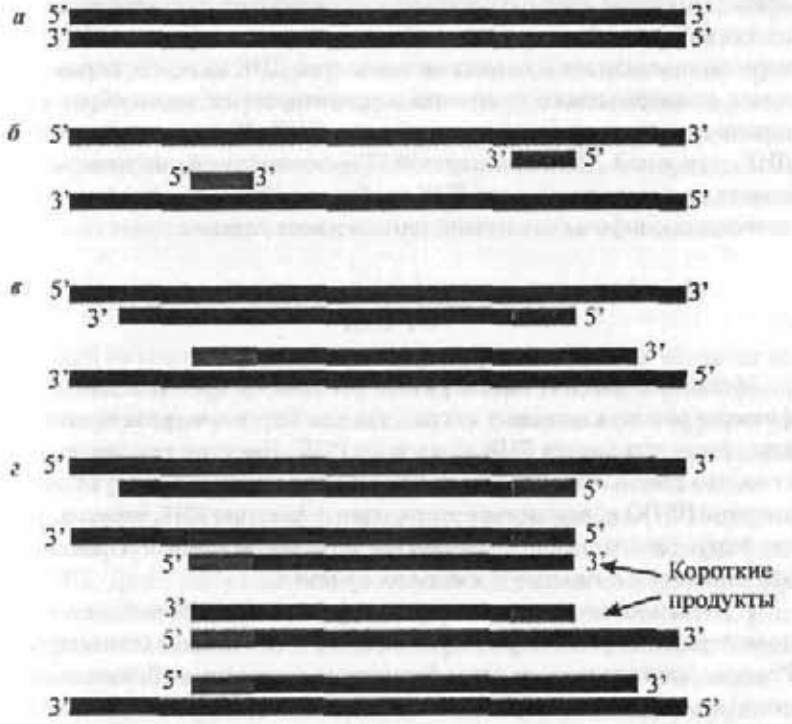


Рис. 6. Схема полимеразной цепной реакции

а – исходная ДНК; **б** – денатурация и образование коротких двухнитевых участков ДНК (отжиг праймеров); **в** – синтез новых цепей ДНК, ограниченных с одной стороны; **г** – синтез коротких цепей ДНК, ограниченных с двух сторон.

фермента всего в два раза. При многократном повторении циклов синтеза происходит экспоненциальное увеличение числа копий специфического фрагмента ДНК, что позволяет из небольшого количества анализируемого материала, который может содержать единичные клетки микроорганизмов, получить достаточное количество копий ДНК-фрагментов для идентификации их электрофорезом или иным способом.

Комплементарное достраивание цепи начинается не в любой точке последовательности ДНК, а только в определенных стартовых блоках- коротких двунитевых участках. Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют две олигонуклеотидные затравки (18-35 нуклеотидов), называемые праймерами. При образовании таких блоков путем отжига на однонитевой ДНК затравок-олигонуклеотидных праймеров можно направить процесс синтеза новой цепи только в этом участке ДНК. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что ограничивают достраивание новой цепи ДНК. Процесс начала синтеза ДНК-зависимой ДНК-полимеразой (Taq-полимеразой) не возможен без отжига на однонитевой цепи ДНК праймеров. Этим, по существу, и определяется специфичность начала синтеза в ходе реакции.

Модификации метода полимеразной цепной реакции ОТ-ПЦР

Механизм простой полимеразной реакции не пригоден для идентификации рибонуклеиновых кислот, так как Taq-полимераза не способна катализировать синтез ДНК на матрице РНК. Вместе с тем хорошо известно, что геномы многих вирусов состоят из молекул рибонуклеиновой кислоты (РНК) и, вследствие этого, идентификация РНК вирусов, таких как вирус гепатита С, представляется актуальной задачей. Практически это решается с помощью нескольких приемов.

1. Использование дополнительного фермента - РНК-зависимой ДНК полимеразы- обратной транскриптазы **ОТ (RT - reverse transcriptase)**. Реакция, катализируемая этим ферментом, приводит к образованию однонитевых фрагментов ДНК, используемых в дальнейшем в амплификации с помощью Taq-полимеразы.

2. Как уже было отмечено выше, Taq-полимераза не способна катализировать процесс обратной траскрипции, то есть синтез однонитевой ДНК на РНК-матрице. Вместе с тем, в 1991 г. Маерсом и Гельфандом был оха-

рактеризован фермент ДНК-зависимая ДНК-полимераза, выделенная из другого экстремального термофила Thermus thermophilus (Tth-полимераза), которая в присутствии ионов марганца катализировала синтез на РНК однонитевой комплементарной ДНК. Последующее добавление в среду ионов магния и хелаторов ионов марганца позволяло ферменту катализировать обычную ДНК-зависимую ДНК-полимеразную реакцию, то-есть этот фермент мог быть использован для одновременного синтеза комплементарных однонитевых фрагментов ДНК и для амплификации ДНК.

Мультипраймерная ПЦР

Под мультипраймерной (мультиплексорной) полимеразной цепной реакцией принято понимать процесс коамплификации нескольких ДНК-матриц в одной реакционной среде с использованием нескольких пар праймеров, что позволяет проводить скрининг сразу по нескольким инфекционным возбудителям, определять одновременно наличие в биопробе комплекса факторов вирулентности и резистентности к антибактериальным и противовирусным препаратам, а также исследовать состояние нескольких аллельных генов у эукариотических организмов, включая человека.

Гнездовая ПЦР (nested PCR)

Одной из распространенных модификаций метода ПЦР является использование двух пар праймеров, одна из которых способна амплифицировать внутренний участок ампликона, полученного после первого раунда амплификации с внешней парой праймеров. Существует несколько вариантов применения гнездовой ПЦР в лабораторной диагностике.

1. Согласно первому варианту проводится амплификация (15-30 циклов) с внешней парой праймеров, при этом амплифицируется основной фрагмент ДНК. Далее часть содержимого переносится в новую пробирку, содержащую реакционную смесь, в состав которой входит пара праймеров, узнающая последовательности, лежащие внутри основного ампликона. Второй раунд амплификации (реамплификации) также составляет 15-30 циклов.

2. Во втором варианте температура отжига внутренней пары праймеров подбирается с таким расчетом, чтобы при проведении первого раунда амплификации они не участвовали в реакции. Обычно температура отжига праймеров в этом варианте гнездовой ПЦР подбирается на 10-15°С ниже, чем для внешней пары праймеров. Программа амплификации в этом слу-

чае состоит из двух программных блоков. После проведения первого программного блока амплификации температура отжига праймеров для второго раунда задается на 10 градусов ниже. Это обеспечивает эффективное участие внутренней пары праймеров во втором раунде амплификации.

Применение гнездовой ПЦР имеет свои преимущества и недостатки. Во-первых, это высокая чувствительность методики. Во-вторых, проведение гнездовой амплификации отменяет необходимость использовать другие методы, подтверждающие специфичность реакции. Кроме того, перенос продуктов реакции из одной пробирки в другую существенно снижает концентрацию ингибиторов, которые могут присутствовать в пробе после выделения нуклеиновых кислот.

Однако несмотря на ощутимые преимущества, перенос ампликона из одной пробирки в другую может приводить к появлению большого количества ложноположительных результатов вследствие перекрестной контаминации проб продуктами амплификации.

In Situ ПЦР

Метод In Situ (IS)- ПЦР стал активно развиваться в последнее время благодаря тому, что он, в отличие от ПЦР, проводимой в растворе, позволяет не только специфически амплифицировать какую-либо последовательность ДНК, но и локализовать ее внутри клетки (рис.7-8). Метод характеризуется такой же высокой чувствительностью, как и ПЦР, проводимая в растворе (возможность амплификации исходно одной копии ДНК-мишени). Способность локализовать специфическую последовательность делает IS-ПЦР неоценимым как в исследовании латентных вирусных инфекций и экспрессии генов в клетке, так и в оценке эффекта действия новых лекарственных средств на клеточном и молекулярном уровне.

Внутриклеточное обнаружение продуктов ПЦР может осуществляться двумя способами: через опосредованную (непрямую) In Situ гибридизацию или прямую детекцию меченых нуклеотидов (например, дигоксигенин-11-дУТФ, флуоресцеин-дУТФ), которые включаются в состав амплифицируемого продукта в процессе ПЦР (прямая IS-ПЦР) (рис.7). В непрямом методе гибридизация меченой ДНК-пробы с амплифицированным продуктом обеспечивает максимальную специфичность при внутриклеточной детекции ПЦР-продуктов.

Мы бы хотели остановиться на некоторых особенностях проведения IS ПЦР. В первую очередь это касается протеолитической обработки ги-

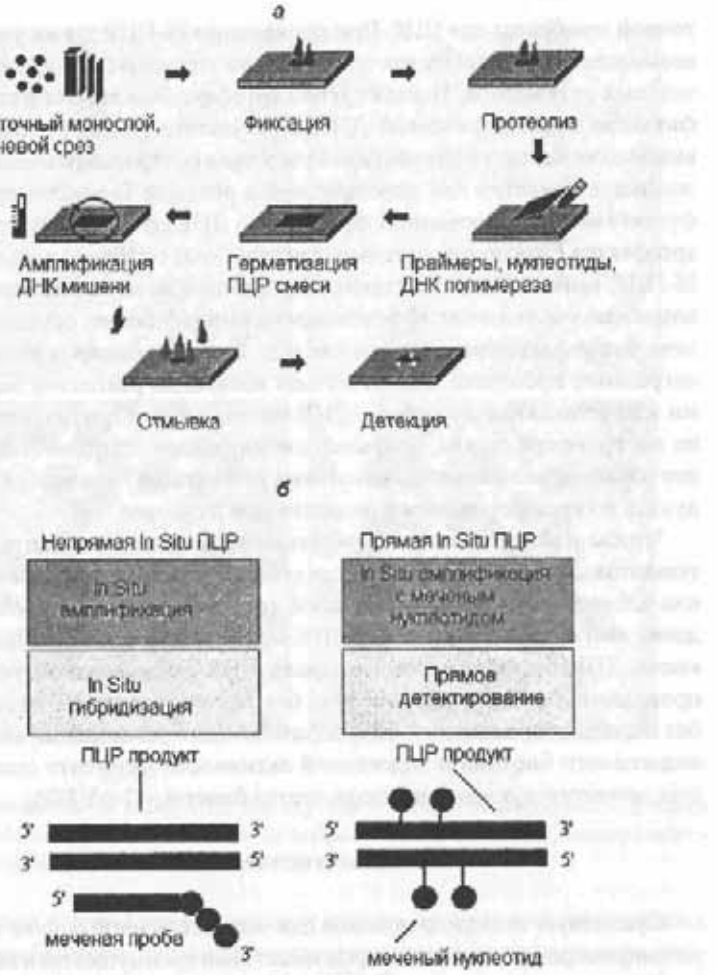


Рис. 7. Принципиальная схема In Situ ПЦР на срезах и клеточных монослоях (а). Методы детекции In Situ ПЦР (б).

стологических срезов или клеточного монослоя. Высокая концентрация протеолитических ферментов (трипсин, пепсин или протеиназа К), или длительное время инкубации с ними часто приводят к искажению морфологической картины препарата, а низкие концентрации - к недостаточному протеолизу и, как следствие этого, к низкой проницаемости кле-

точной мембраны для ПЦР. При проведении IS-ПЦР также учитывается возможность получения как ложно-положительных, так и ложноотрицательных результатов. Первая группа артефактов включает в себя амплификацию неспецифической ДНК в результате ПЦР, неспецифическое включение меченого нуклеотида вследствие репаративных свойств ДНК-полимеразы клетки или используемой в реакции Taq-полимеразы, диффузию амплифицированных фрагментов ДНК из клеток. Вторая группа артефактов (ложноотрицательные результаты) особенно характерна для IS-ПЦР, выполненной на стекле. Их причина до конца не выяснена, но возможно уменьшение эффективности амплификации обусловлено физическими факторами, такими как недостаточно быстрое охлаждение и нагревание препарата, недостаточная конвекция реагентов под зажимами или возможная адсорбция ДНК-полимеразы и других компонентов на поверхности стекла, покрытой специальным агентом. Альтернативное объяснение ложно-отрицательных результатов - это потеря ПЦР-продуктов во время промывок препарата при детекции.

Чтобы избежать ложноотрицательных и ложноположительных результатов обычно выполняют следующие контроли: обработка срезов или клеточного монослоя ДНК-азой (отрицательный контроль), проведение амплификации ДНК без ДНК-полимеразы; проведение амплификации ДНК без праймеров (контроль ДНК-полимеразной репарации), проведение процедуры выявления без использования антител, а также без использования щелочной фосфатазы - для регистрации содержания эндогенного биотина и эндогенной активности фермента (если в качестве меченого нуклеотида используется биотин –11-дУТФ).

Количественная ПЦР

Существует несколько приемов для количественной оценки продуктов амплификации, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки.

Вначале необходимо получить представления о том, какие причины могут влиять на точность измерения ампликонов и что такое количественная ПЦР. Как и любая биохимическая реакция, протекающая in vitro, ПЦР имеет ряд существенных отклонений от теоретически предсказанной закономерности накопления продукта, происходящего не по закону геометрической прогрессии, а по сложному закону, обусловленному истощением реагирующих компонентов, присутствием ингибиторов, инактивацией фермента в ходе реакции и т.д. Принять во внимание все эти

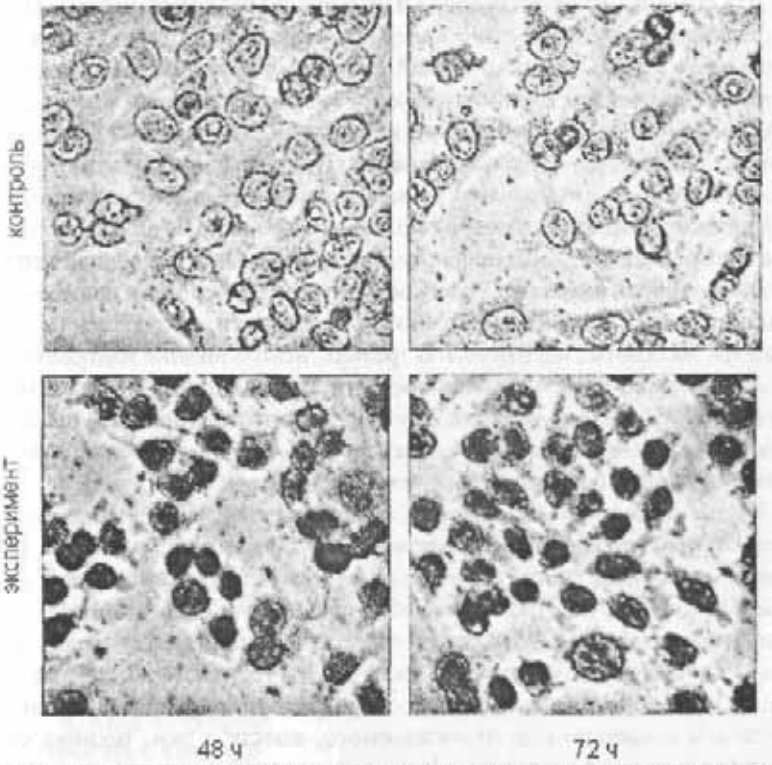


Рис. 8. Использование In Situ ПЦР для внутриклеточного обнаружения M.hominis в клетках HeLa. Контроль - клетки, не зараженные микоплазмой, эксперимент - клетки - инфицированные микоплазмой.

факторы при расчете калибровочных кривых практически невозможно, поэтому необходимо применение методик, позволяющих учитывать многочисленные параметры в ходе самой ПЦР. Исследователь не может быть до конца уверен в том, что все испытуемые образцы при изначально одинаковых условиях по реагентам и температуре в термоблоке дают одинаковый выход продукта. Из вышесказанного следует, что действенным способом борьбы с недостатками ПЦР как метода количественного определения мишеней амплификации являются методические приемы, позволяющие регистрировать протекание реакции или вносить поправки, выявляя возможные артефакты в каждой пробе.

Для создания количественной ПЦР наиболее распространены подходы, использующие внутренние контроли- стандарты, которые, как и определяемая ДНК, участвуют в ПЦР. Используя контроли -стандарты с разным количеством копий на образец, можно определить количество копий матрицы, участвующей в реакции (рис.9). Внутренний контроль-стандарт выполняет несколько функций. Во-первых, он позволяет выявить возможное ингибирование реакции ингибиторами, содержащимися в выделенном клиническом образце. Во-вторых, использование контроля в ходе реакции в той же пробирке, где происходит определение испытуемой матрицы, позволяет учесть эффект неравномерности протекания реакции, так как условия амплификации стандарта и определяемой ДНК или РНК абсолютно идентичны. В третьих, использование контроля позволяет в значительной степени абстрагироваться от изучения закономерностей протекания реакции, так как основным алгоритмом определения является совпадение интенсивности сигнала от внутреннего контроля-стандарта и сигнала от определяемого ампликона.

Кроме описанного выше метода количественной ПЦР с использованием внутреннего контроля на практике используется еще один прием, получивший название "метод конечных разведений". Суть подхода в том, что определяется конечное разведение образца ДНК или РНК, дающее положительный результат ПЦР. В каждом определении используется панель стандартов для выявления чувствительности работы тест-системы. Этот метод не дает реальной возможности контролировать процесс амплификации со всеми его отклонениями от ожидаемого, вместе с тем, техника его наиболее проста в исполнении. Из-за методической простоты некоторые лаборатории до сих пор используют этот метод для так называемых внутрилабораторных (in house) технологий. Такой подход неприемлем для отечественной лабораторной службы, строго регламентирующей возможность работы только с сертифицированными наборами реагентов.

На сегодняшний день известен способ решения проблемы количественного определения ампликона в ходе реакции (Real time PCR). Речь идет о регистрации накопления продуктов реакции в реальном времени и построении калибровочных кривых по реальным процессам, происходящим в каждой конкретной пробирке. «Taqman» (http://www.geneprobe.com) (термин, очевидно, придуманный по аналогии с популярной компьютерной игрой 80-х "puckman")-технология, предложенная специалистами Perkin Elmer совместно с Roche. В основе метода лежит способность Taq-полимеразы гидролизовать последовательность

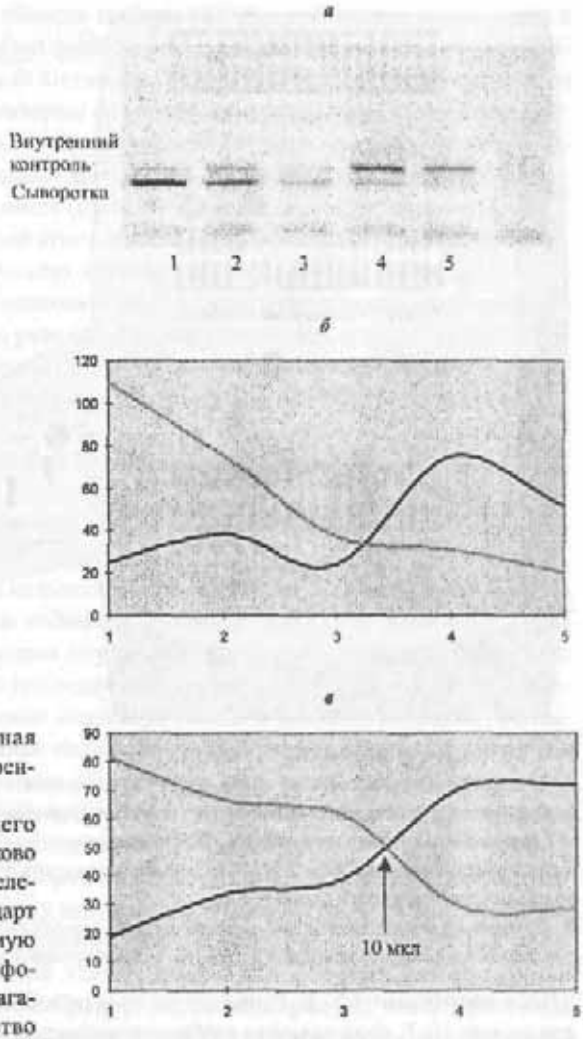


Рис. 9. Количественная ПЦР гепатита С с внутренним стандартом. Количество внутреннего стандарта везде одинаково (10 тыс. копий/на выделение). Внутренний стандарт добавлялся в тестируемую сыворотку. **а.** Электрофорез продуктов ПЦР в агарозном геле. Количество сыворотки (мкл) *1* – 50; *2* – 25; *3* – 12,5; *4* – 6; *5* – 3. **б.** *Концентрационные зависимости накопления* продуктов ПЦР (данные обработаны с помощью программного обеспечения GelDoc компании Bio-Rad). **в.** Те же концентрационные кривые, только "отнормированные" на общий сигнал (за 100% принят суммарный сигнал продуктов ПЦР). Количество копий вируса гепатита С 1млн/мл. сыворотки.

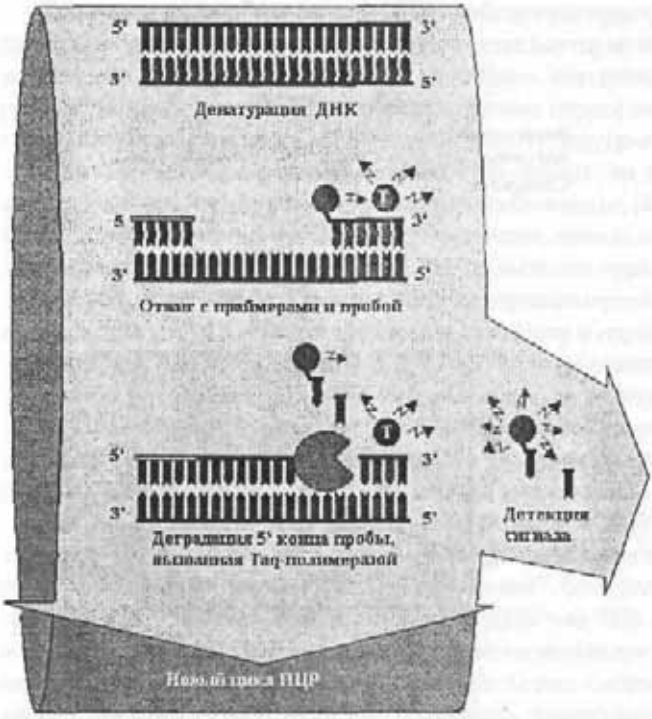


Рис. 10. Количественная ПЦР. Схема TaqMan.

А. В ходе реакции к образцу добавляется специальный зонд, модифицированный, двумя флуоресцентными красителями З и Т, имеющими близкие максимумы поглощения и флуоресценции. **Б**. При наличии специфической матрицы в начале амплификации происходит смещение максимума флуоресценции из-за деградации олигонуклеотидного зонда.

В. Измерение флуоресценции в каждой амплификационной ячейке позволяет рассчитывать количество исходной матрицы, используемой в реакции амплификации.

ДНК в направлении 5'-3'. Принцип работы подобной системы представлен на рис.10. В ходе реакции к образцу добавляется специальный зонд, модифицированный двумя флуоресцентными красителями, имеющими близкие максимумы поглощения и флуоресценции. Расстояние между молекулами красителей на зонде подобрано таким образом, что происходит перенос энергии от одной молекулы - испускающей первичный квант флуоресценции (З), к другой, которая испускает квант света в бо-

лее длинноволновой области спектра (Т). Амплификация происходит в специальном приборе, который оснащен устройством освещения возбуждающим светом каждой амплификационной ячейки и многоканальным флуоресцентным детектором со спектральным разрешением анализируемого сигнала. При наличии специфической матрицы в начале амплификации происходит смещение максимума флуоресценции из-за деградации олигонуклеотидного зонда (из-за 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы) и, вследствие этого, отменой переноса энергии от одного флуорофора к другому. Анализ кинетики флуоресценции в каждой амплификационной ячейке позволяет рассчитывать количество исходной матрицы, используемой в реакции амплификации. Кроме того, анализ в реальном времени позволяет регистрировать все артефакты, связанные с вышеперечисленными причинами, и вносить необходимые поправки.

Методы выявления продуктов реакции амплификации.

Синтезируемый в ходе реакции продукт можно детектировать различными способами. Одним из самых простых, эффективных и распространенных способов является электрофоретическое разделение ампликонов в агарозном или полиакриламидном гелях с детекцией ДНК при помощи интеркалирующих флуоресцентных зондов, таких, например, как бромистый этидий. В последнее время получают широкое распространение гибридизационные методы детекции в планшетном формате с иммуноферментной стадией выявления продуктов амплификации (рис.11а). Возможно также и прямое измерение флуоресценции олигонуклеотидного зонда после его гибридизации с продуктами реакции в жидкой фазе, либо на специальной подложке (рис.11б). Существуют и другие методы, позволяющие проанализировать образующийся в ходе реакции амплификации продукт. К числу таких методов следует отнести высокоэффективную жидкостную хроматографию, капиллярный электрофорез, масс-спектроскопию. Развитие этих подходов способствует автоматизации регистрации результатов. Следует особо подчеркнуть, что аналогичные приемы используются в настоящее время и в биологических микросистемах-биочипах, в подавляющем большинстве являющихся ни чем иным, как миниатюрными устройствами для детекции продуктов амплификации.. Подробнее технические принципы, используемые для создания биочипов, и перспективы их применения в медицине будут рассмотрены нами при дальнейшем изложении материала.

Рис. 11. Плашечная схема детекции продуктов ПЦР: **а.** Иммуноферментная детекция с использованием флюорогенного субстрата; **б.** Прямая детекция флюоресцинмеченного зонда.

Применение ПЦР в здравоохранении

Использование метода ПЦР для диагностики инфекционных заболеваний как бактериальной, так и вирусной природы имеет иногда важное значение для решения многих проблем микробиологии и эпидемиологии. Применение этого метода также способствует развитию фун-

даментальных исследований в области изучения патогенеза хронических инфекционных заболеваний. Однако следует отметить, что метод ПЦР лишь дополняет спектр традиционных методов, используемых в микробиологической диагностике в настоящее время. Наиболее рационально и эффективно применение ПЦР для обнаружения микроорганизмов, трудно культивируемых в лабораторных условиях, атипичных форм бактерий. К ним также относятся внутриклеточные паразиты и микроорганизмы, способные длительно персистировать в организме хозяина без клинических симптомов. Особое место в этом ряду занимают микобактерии туберкулеза, вирусные инфекционные агенты.

Высокоспецифичная, чувствительная и быстрая диагностика многих тяжелых заболеваний способствует не только их эффективному лечению, но и предотвращению распространения инфекции.

Наиболее эффективно и экономически обосновано использование метода в **урогинекологической практике** для выявления хламидиоза, микоплазмозов, хронической гонореи, герпеса, гардпереллеза; **в пульмонологии** для дифференциальной диагностики вирусных и бактериальных пневмоний, туберкулеза; **в гастроэнтерологии** для выявления хеликобактериоза; **в клинике инфекционных заболеваний** в качестве экспресс-метода диагностики сальмонеллеза, дифтерии, вирусных гепатитов B, C и G; **в гематологии** для выявления цитомегаловирусной инфекции, онковирусов.

Наряду с использованием метода ПЦР для выявления и дифференциальной диагностики инфекционных агентов бактериальной и вирусной природы необходимо отметить, что амплификационная диагностика постепенно занимает свое место и в арсенале методов, направленных на выявление предрасположенности обследуемых пациентов к онкологическим заболеваниям, микродиссеминации опухолей, исследование наследственных заболеваний, молекулярную идентификацию личности и т.д. Вместе с тем необходимо понимать, что перечисленные выше направления требуют комплексного анализа, сочетающего амплификационные технологии с другими методами молекулярной биологии и генетики.

Для целей практической ДНК-диагностики помимо амплификационных и гибридизационных технологий применяются также и другие методы, позволяющие решить проблему установления характерных свойств биообъекта, например, его принадлежность к определенному штамму, наличие факторов вирулентности и т.д. Среди этих методов необходимо выделить электрофорез в переменном электрическом поле, позволяющий разделять большие фрагменты ДНК и даже целые хромосомы, метод полиморфизма длин

рестрикционных фрагментов (ПДРФ) и определение нуклеотидных последовательностей отдельных участков генома. Для анализа присутствия точечных мутаций часто используются методы прямого секвенирования или анализ конформационных отличий одноцитевых фрагментов ДНК (SSCP).

Биологические чипы

В последнее время активно развиваются ДНК-технологии, которые позволяют не только определять признак, но и одновременно проводить дифференциальный секвенс, т.е. определение точечных мутаций или полиморфизма в известных участках генома. Данные технологии имеют значительные преимущества перед традиционными молекулярно-биологическими методами, т.к. они позволяют миниатюризировать исследуемый образец и анализатор, что значительно снижает стоимость анализа и время его проведения, а также одновременно определять различные параметры исследуемого образца, причем без потери чувствительности амплификационных методов.

В 1975 г Эд Саузерн использовал меченую нуклеиновую кислоту для детекции специфической последовательности среди ДНК фрагментов, иммобилизованных на твердой подложке. Саузерн блот - это был первый ДНК-чип. Основа всех современных ДНК-технологий – гибридизация, т.е. взаимодействие комплементарных цепей нуклеиновых кислот. Используемые для определения параметров гибридизации устройства позволяют регистрировать не только конечный результат, но и кинетику ассоциации и диссоциации комплементарных цепей.. Эти технологии, делая возможным многопараметрический анализ образцов, предоставляют больше информации исследователям и врачам, что несомненно важно для диагностики и лечения заболевания.

Для удобства понимания современного состояния «ДНК-технологий» представляется необходимым привести их условную классификацию (Схема 1). В ней мы попытались учесть способы детекции сигнала, методы гибридизации, иммобилизации проб (олигонуклеотидов) на поверхности, типы иммобилизационных поверхностей. Как видно из схемы, в настоящее время существуют два принципиально разных подхода для анализа образцов. Первый позволяет быстро получать разнообразную информацию о геноме, экспрессии и мутациях генов, используя большое количество олигонуклеотидных проб в коммерческом ДНК-чипе. Второй подход реализован в оптических биосенсорах и оставляет иссле-

Схема 1.

КЛАССИФИКАЦИЯ ДНК ЧИПОВ

дователям больше возможности для манипуляций, изучения и анализа интересующих генов, так как система является открытой. Прежде чем подробно рассматривать эти подходы, необходимо выяснить, какой фактический материал имеется в руках исследователей.

Информационные ресурсы. Оценка состояния и идентификация всех генов исследуемого организма является одной из важнейших задач, поставленных перед разработчиками ДНК-чипов. Решение этой задачи может быть реализовано в иммобилизации всех генов организма на биологический чип, что позволит комплексно оценить состояние генов и генома в целом. Очень скоро будет расшифрован геном человека, а также многих модельных организмов. Однако, на сегодняшний день нуклеотидная последовательность большинства геномов – за исключением *Saccaromyces cerevisiae, Caenorhabditis elegans* и нескольких микробов (*Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia trachomatis* и т.д) – до конца не расшифрована. Следовательно то количество информации о генах индивидуального организма, которое можно заложить в биочип, ограничено. Вся информация о генах и целых геномах различных организмов, известная на сегодняшний день, систематизируется и хранится в так называемых базах данных. Наиболее мощные биомедицинские базы данных созданы Национальным Центром Биотехнологической Информации (GenBank, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), Европейским Институтом Биоинформатики (EMBL, http://www.ebi.ac.uk) и Японским Национальным Институтом Генетики и Центром Биологической Информации (DDBJ, http://www.ddbj.nig.ac.jp). GenBank Национального Центра Биотехнологической Информации содержит информацию о 4 865 000 нуклеотидных последовательностях. Эти базы данных являются составными частями Международного Нуклеотидного Банка Данных. Существуют и специализированные базы данных - IMAGE (Integrated Analysis of Genomes and their Expression, http://www-biol.llnl.gov/bbrp/image/image.htlm), CGAP (Cancer Genome Anatomy Project, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/gene_discovery.htlm), где депонируется не только информация о всех последовательностях генов человека, но и есть клоны, содержащие эти гены. EST (expressed sequence tag) последовательности человека находятся в базе данных dbEST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.htlm). EST последовательности автоматически сравниваются системой UniGene и группируются в кластеры по признакам (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/index.htlm). Некоторые EST последовательности соответствуют уже известным генам, но большая их часть представляют собой частично сиквени-

рованные новые гены. Большое количество EST последовательностей идентифицировано Институтом геномных исследований (TIGR, Institute for Genomic Research, http://www.tigr.org). Американская коллекция тканевых культур располагает индивидуальными человеческими и мышиными TIGR клонами, включая клоны с открытыми рамками считывания нуклеотидной последовательности. Genome Systems (Сент Луис, США, http://www.genomesystems.com) и Research Genetics (США, Хантсвил, http://www.resgen.com) используют IMAGE клоны в производстве своих чипов. При этом учитываются следующие факторы, а именно: рестрицированы ли клоны, т.е. изолирована ли единичная клетка, и сиквенированы ли повторно клоны (потвержденные или непотвержденные клоны). Таким образом, биогенетические базы данных, содержащие всю информацию (систематизированную) по генам и геномам различных организмов, представляют исследователям огромные возможности в дизайне ДНК-чипов.

Технология ДНК - чипов.

Технология ДНК-чипов, как уже отмечалось выше, основана на гибридизации неизвестной нуклеотидной последовательности с расположенными в определенном порядке известными ДНК-последовательностями, иммобилизованными на поверхности стекла или кремния. Результат детектируется по флуоресценции зонда, предварительно меченного флуорофором и гибридизованного с одной из иммобилизованных проб.

Несколько компаний в мире развивают и производят различные версии ДНК- чипов. Так, например, Affymetrix (Санта Клара, США, http://www.affymetrix.com) создал GeneChip-технологию, основанную на высокоплотных чипах, содержащих ДНК-последовательности, как метод анализа генетической информации о геноме человека (рис.12).

Производство ДНК-чипов. ДНК чипы производятся по одной из двух основных технологий. Одна из них позволяет проводить синтез олигонуклеотидов непосредственно на стеклянной (кремниевой) подложке. Альтернативный метод заключается в нанесении уже синтезированной ДНК (кДНК) на подложку, которая инкубируется с флуоресцентно–меченным ДНК-зондом. Эта разновидность чипов с высокой пропускной способностью является превосходным инструментом в руках исследователя.

Примером использования первого подхода является «GeneChip» компании Affymetrix, созданный на основе полупроводниковой фотолитографии и светонаправленного химического синтеза. Разделение светонап-

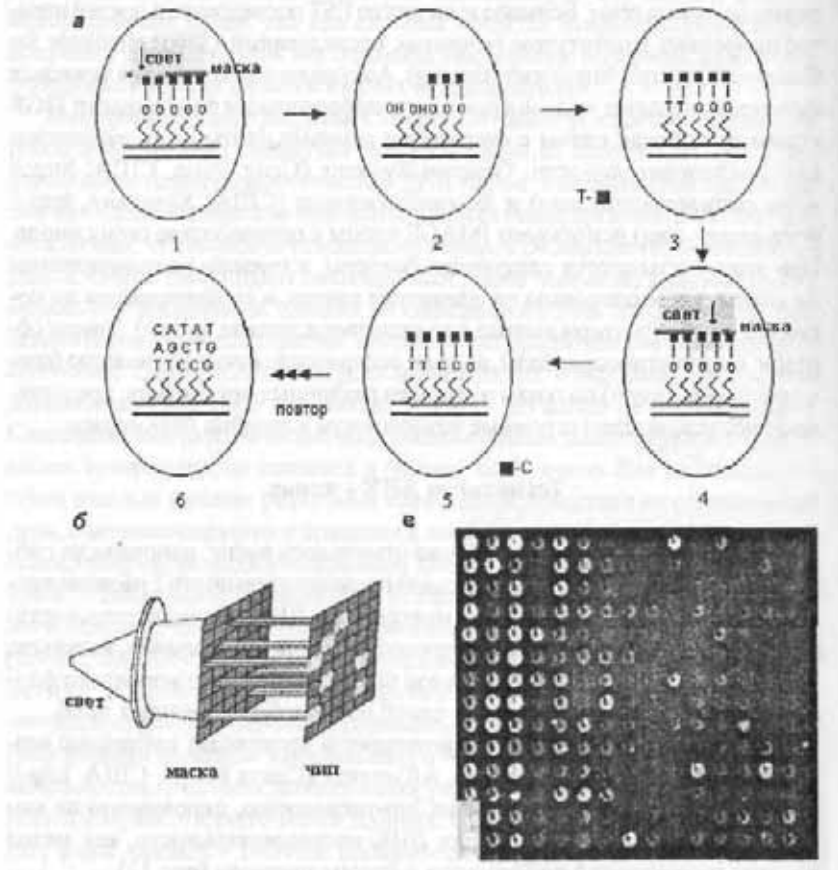


Рис. 12. **а.** Принципиальная схема синтеза олигонуклеотидов на кремниевую основу GeneChip компании Affymetrix. а) селективное освещение светом поверхности чипа через фотолитографическую маску; б) активация освещенных областей; в) инкубация с нуклеотидами, образование химической связи происходит только в активизированных позициях; г) накладывается новая маска; д) инкубация с нуклеотидами; е) процесс повторяется до тех пор, пока желательный набор проб не будет получен.

б. Схематическое расположение источника света, маски и чипа.

в. Профиль сканирования, получаемый на GeneChip. Интенсивность и цвет каждого сектора отражает информацию о гене из тестируемого образца.

равленных химических реакций для синтеза индивидуальных олигонуклеотидов в пределах 5 – 10 мкм достигается с помощью фотолитографических масок. При этом возможен адресный синтез всех возможных комбинаций пуклеотидов (A, T, G, C), входящих в состав синтезируемых проб, причем длина их может быть различна (обычно 16 оснований). Миниатюрные олигонуклеотидные чипы, синтезируемые в результате светонаправленной химической реакции, позволяют получить до 50 000 различных проб на 1,28 см^2, причем каждый сектор высотой и шириной 50 мкм содержит 1 000 000 копий специфической индивидуальной олигонуклеотидной пробы (рис.12). Необходимо отметить, что именно такие высокоплотные матрицы и называются ДНК – чипами.

Олигонуклеотидный синтез непосредственно на подложку также используется Protogene Laboratories (Пало Альто, США, http://www.protogene.com), Incyte Pharmaceuticals (Пало Альто, http://www.incyte.com), Немецким Институтом Опухоли (Гейдельберг, Германия, http://www.dkfz-heidelberg.de). Сравнительная характеристика некоторых биочипов приведена в таблице 1.

ДНК-матрицы могут "печататься" роботом на стеклянную, нейлоновую, полипропиленовую и кремниевую поверхность (слайд). Такую технологию нанесения проб используют Axys Pharmaceuticals (Сан Диего, США, http://www.axypharm.com), HySeq (Сиднивал, США, http://www.hyseq.com), TeleChem International (Сиднивал, США, http://arrayit.com). Подобные чипы обычно используют для детекции мутаций, локализации последовательности - мишени внутри гена, изучения экспрессии гена и определения функции гена.

Хотелось бы отметить, что для работы с нейлоновыми фильтрами не требуется никакого специального оборудования, хотя исследователь должен знать, что для больших фильтров (22 см^2) может потребоваться прибор, регистрирующий радиоактивный профиль (phosphorimager) с большим экраном. Фильтры удобны для проведения анализа РНК, так как требуется максимально 50 нг тотальной РНК для одного эксперимента (100 мкг РНК обычно используется при флуоресцентном мечении). Главный недостаток фильтров состоит в том, что сравнение экспрессии между двумя образцами требует гибридизации каждого образца на двух отдельных фильтрах. Чувствительности ДНК–чипов на фильтре не хватает для регистрации однокопийных генов. Основные производители таких чипов (ДНК–полей) - Clontech (Пало Альто, США, http://www.clontech.com), Genome Systems и Research Genetics (таблица 2). Использование стеклянных (крем-

Таблица 1

Высокоплотные ДНК – чипы (Bowtell D.)

	Incyte/Synteni: UniGEN V	**Affymetrix** GeneChip
Назначение биочипов	Анализ генов человека: 10 000 CB клонов, 5 524 известных гена и 4 320 генов, имеющих выраженный признак последовательности (EST). Анализ генов мыши: 10 000 CB IMAGE клонов. 60% известных или гомологичных генов (EST) S.cerevisiae: полный набор открытых рамок считывания	Анализ генов человека: Hu6800, Hu35K set = 42 000 генов/EST (UniGene). Анализ генов мыши: Mu6500 set, Mu11K set, Mu19K set = 30 000 генов/EST (UniGene, TIGR) S.cerevisiae: Ye6100
Спецификация	'1x3' чип (слайд). До 10 000 элементов (последовательностей) на см^2. Предел чувствительность: меньше одного гена на 100 000 в ячейке. Динамический диапазон: изменение экспрессии гена в 2 и более раз.	1 700 – 7 000 последовательностей на чип. Используется 40 специфических проб для анализа каждой последовательности. Чувствительность 1:100 000. Динамический диапазон: изменение экспрессии гена в 2 и более раз.
Доступность и стоимость чипов	Слайды не продаются, только данные с них. Чипы изготовляются по заказу. Набор последовательностей на чипе определяется заказчиком. Стандартный GEM чип содержит нуклеотидные последовательности из UniGene коллекции. Минимальный лот: 25 микрочипов с кДНК в количестве 1 000 – 10 000. Стоимость $ 4 000 на два образца.	От $ 0.29 до $ 0.5 на индивидуальный ген человека или EST профиль; $0.26 – 0.38 для мыши.

Устройство для детекции (сканеры)	Не доступно	Возможна покупка станций и сканеров фирмы Affymetrix через сеть компании Amersham.
Программное обеспечение (п.о.)	GEMTolls п. о. для анализа данных. Стоимость от $ 1 895 (для разового использования) до $ 300 000 (для групповых пользователей)	GeneChip п.о. позволяет контролировать инструментальную часть, гибридизацию, получать информацию об уровне экспрессии, создавать собственную базу данных. Стоимость п.о. EDMT $2500-3250 и LIMS $70 000- 98 000

CB, клоны верифицированные секвенированием нуклеотидной последовательности

Таблица 2

ДНК – чипы на фильтрах (Bowtell D.)

	Genome Systems	**Research Genetics**	**Clontech**
Назначение биочипов	Анализ генов человека и мыши	Анализ известных генов человека и S.cerevisiae	Анализ генов человека, мыши и крысы, фильтры для исследования опухолевых заболеваний человека, нейробиологии, апоптоза, гематологии и т.д.
Размеры фильтров и количество клонов (последоватльностей) на них	22 см^2, 18 342 последовательности (продублированные)	5x7 см, содержащие 5 184 последовательности и геномные ДНК контроли для ориентации и контролирования четности гибридизации	80x120 мм, 588 генов (продублированных) и также контроли

Источники клонов (нуклеотидных последовательностей)	IMAGE Используются как известные человеческие и мышиные гены, так и неизвестные гены, но имеющие выраженный признак последовательности (EST)	IMAGE/CGAP	Только известные гены
Спецификации фильтров	Анализ генов человека GDA 1.2 (не подтвержденные клоны): 1 939 известных гена 16 887 EST кластеров Анализ генов мыши GDA 1.0 1 037 известных гена 16479 ETS кластеров	Анализ генов человека V1.0 4 015 СВ известных генов (подтвержденных) Анализ дрожжей (ORF) Содержит полный набор из 6 144 открытых рамок считывания	Фильтры содержат ген-специфический фрагмент 200-500 п.н. Все фрагменты подтверждены секвенированием и продублированы. Возможно нанесение до 588 кДНК
Источники ДНК, иммобилизованной на фильтре	Лизированные колонии	Очищенная ДНК	ПЦР – фрагмент, СВ
Стоимость фильтра	GDA1.2 $ 1259 за 2	V 1.0 $ 960/фильтр Дрожжи ORF $ 1325	$550 - 950 за 2 мембраны, реагенты, протокол
Анализ результатов	Изотопная детекция с помощью прибора, регистрирующего радиоактивный профиль фильтра (phosphorimager). П.о. позволяет количественно оценивать результаты гибридизации. Возможен анализ данных на сервере компании $199/фильтр. Данные посылаются через WWW.	Изотопная детекция. Стоимость п.о. $ 2 850. Нет сервисной службы анализа данных в WWW.	П.о. AtlasImage доступно с января 1999 г.

П.о, программное обеспечение; СВ, клоны верифицированные секвенированием нуклеотидной последовательности.

ниевых) подложек в производстве ДНК – чипов более предпочтительно. Во-первых, ДНК-проба может быть ковалентно связана с предварительно обработанной поверхностью слайда. Во-вторых, стекло - долговечный материал, который выдерживает высокие температуры и инкубацию в растворах с высокой ионной силой. В третьих, оно не является пористым, т.е. объем гибридизационного буфера может быть минимальным, что увеличит скорость ассоциации пробы с мишенью. В четвертых, собственная флуоресцентная активность стекла очень низка и таким образом не вносит значительный вклад в фон. И, наконец, два различных зонда, могут быть помечены различными флуорофорами и, следовательно, инкубироваться одновременно в одном ДНК – чипе.

В России биологические микрочипы разрабатываются с 1988 г. в *Институте Молекулярной Биологии* (Москва, РФ, http://www.eimb.relarn.ru) под руководством акад. А.Д. Мирзабекова. В данной технологии ДНК-чипы реализованы на основе миниатюрных гелей, которые физически разделены на стеклянной подложке, а пространство между ними заполнено гидрофобным веществом для того, чтобы элиминировать или значительно уменьшить взаимодействие между соседними микрогелями. В каждый микрогель биохимическим роботом вносится только один тип ДНК-пробы. Процедура изготовления микрочипов заметно снижает фоновую флуоресценцию, а высокопористый гель позволяет иммобилизовать ДНК длиной до 200 нуклеотидов. Размеры микрогеля могут варьировать от 10x10 мкм до 1x1 мм, что позволяет создавать чипы с различным числом проб. Например, была продемонстрирована возможность секвенирования ДНК-мишени длиной до 50 нуклеотидов на микрочипе, несущем все возможные комбинации гексамеров.

Для повышения эффективности "печати" ДНК-матриц на подложку используют иммобилизацию проб в электрическом поле или на положительно заряженную подложку. Incyte Pharmaceuticals и Nanogen (Сан Диего, США, http://www.nanogen.com) применяют технику нанесения в электрическом поле. Иммобилизация кДНК на заряженную подложку используется Molecular Dynamics (Синнивил, США, http://www.mdyn.com), Genetics MicroSystems (Вобурн, США, http://www.geneticmicro.com), Genome Systems, Clontech и Radius Biosciences (Медфилд, США, http://www.ultranet.com/~radius).

Гибридизация на ДНК- чипах. Гибридизация на чипе заключается во взаимодействии комплементарных цепей ДНК: одна из них (ДНК–

проба) с известной последовательностью нуклеотидов иммобилизована на подложке, а другая одноцепочечная ДНК–мишень (зонд), меченная флуоресцентной меткой, вносится в ДНК-чип (рис.13). Результаты гибридизации зависят от длины ДНК – пробы, химического состава меченой ДНК – мишени, температуры, при которой проводится гибридизация, состава гибридизационной смеси, типа флуоресцентной метки. Здесь необходимо отметить, что в ДНК-чипах в основном используется пассивная гибридизация, т.е. взаимодействие ДНК–мишени с иммобилизованной пробой является вероятностным процессом и зависит от условий, указанных выше. С этой точки зрения интересны разработки компании Nanogen. Технологии этой компании базируются на том факте, что большинство биологических молекул либо положительно, либо отрицательно заряжены. Использование микроэлектроники позволяет активно перемещать (электронная адресация) и концентрировать заряженные молекулы в специфическом сайте на полупроводниковом микрочипе. Технология Nanogen находит применение в анализе неизвестной заряженной биологической молекулы, способной специфически связываться с известными молекулами на микрочипе. Электромагнитная адресация применяется как на стадии иммобилизации ДНК - проб на кремниевую подложку, так и на стадии гибридизации. На первой – синтезированные ДНК–пробы с помощью электроники помещаются или "адресуются" на специфический сайт на микрочипе. На второй стадии электромагнитные поля, создаваемые на микрочипе, перемещают и концентрируют ДНК–

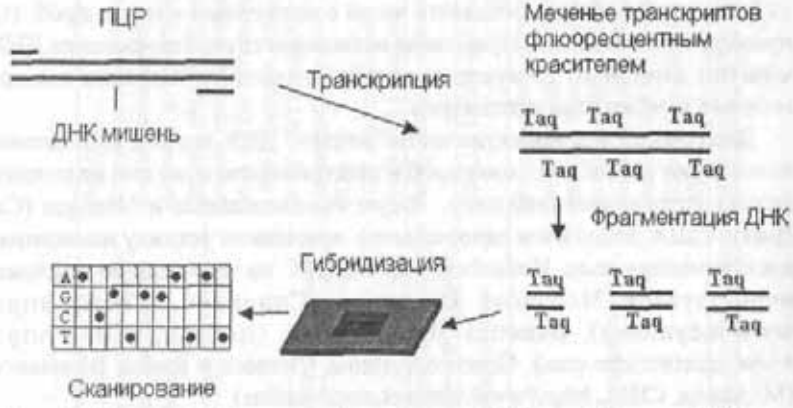


Рис. 13. Подготовка образца и гибридизация на ДНК чипе (Ramsay, 1998)

мишени на сайте, имеющем наибольшее соответствие по электромагнитному профилю. Таким образом электронная активная гибридизация протекает в несколько десятков раз быстрее и эффективнее по сравнению с пассивной, не электронной гибридизацией.

Детекция сигнала на ДНК-чипах. Фильтры гибридизуются с P^{32} – меченным зондом и сигнал регистрируется с помощью системы, оценивающей радиоактивный профиль. Такие приборы выпускаются компаниями Molecular Dynamics, Packard Instruments и Fuji (http://www.fujifilm.de). Система Cyclone компании Packard имеет относительно низкую стоимость и обеспечивает высокую степень разрешения. Фильтры можно оценивать также зрительно. Компании, производящие фильтры, имеют сервисные службы, оценивающие GIFF файлы, посланные через Интернет.

Детекция гибридизационного сигнала большинством компаний осуществляется специально разработанными флуоресцентными сканерами (таблица 3). Система детекции компании Affymetrix требует лазерного конфокального сканирующего устройства, которое было разработано Hewlett-Packard. Флуоресцентная эмиссия через микроскоп и фотоэлектронный умножитель поступает на детектирующее устройство. Флуоресцентная детекция является наиболее удобной и относительно дешевой. Минимальная ячейка детекции 10 мкм, минимальный размер пикселя 3 мкм, а максимальный - 24 мкм. Флуоресцентный сканер компании *Nanogen регистрирует менее 500 молекул на каждый специфический сайт.* А система детекции Genetic MicroSystems имеет разрешающую способность в пикселях 10 мкм и чувствительность менее 1 молекулы Cy3 на 1 мкм^2. Из приведенных выше основных технических характеристик сканеров, разработанных в ведущих компаниях, видно, что все эти устройства имеют примерно одинаковый измерительный потенциал и очень *высокую чувствительность измерения.*

В последнее время предпринимаются попытки использовать кроме флуоресцентного анализа новые высоко чувствительные методы детекции, такие как масс-спектрометрия, хемилюминесценция, оптоволоконные технологии, диодные детекторы, детекция электрических зарядов.

Отдельно мы бы хотели остановиться на технологии микрошаров (микросфер), предложенной компанией Luminex (Остин, США, http://www.luminexcorp.com). Они представляют собой микроскопические шарики, которые способны нести различные молекулы. Возможно покрытие карбоксилированной поверхности микросферы молекулами

Таблица 3

Сканеры (Bowtell D.)

	Genomic Solutions GeneTAC 1000	Packard BioChip Imager	General Scanning ScanArray3000	Beecher Instruments	Molecular Dynamics Avalanche	Genetic Microsystems GMS 418 Array Scanner
Основные компоненты	ССД камера (1.36 млн. пиксель). Ксеноновый источник света. Фильтры позволяют дифференцировать до 4 флуорофоров на слайд. Область изображения 28 x36 мм	Эпи-флуоресцентная конфокальная сканирующая лазерная система. 543 нм (CY3) и 633 нм (CY5) гелий-неоновый лазеры	Сканирующая конфокальная лазерная система 543 нм и 632 нм	Сканирующая конфокальная лазерная система. 3 лазера: 488 нм - 75 мВ 532 нм - 100 мВ 633 нм - 35 мВ	Конфокальная оптика с 9 линзами. 4 эмиссионных фильтра. 2 лазера: 532 нм и 633 нм.	Сканирующий лазерный эпи-флуоресцентный микроскоп. 532 нм (35 мВ) и 635 нм (35 мВ)
Разрешение	27 мкм	50 мкм, 20 мкм или 10 мкм	10 мкм	-	10 мкм или 20 мкм	10 мкм
Скорость	До 24 слайдов за пробег. От 20 сек до 2 мин на флуорофор-	-	За 4 мин поле 20x20 мм	Максимальная сканирующая скорость 80 мм/сек	1 слайд, 1 флуорофор - 5 мин, 1 слайд, 2 флуорофора – 11 мин	3 мин/слайд
Чувствительность	-	< 34.5 CY3молекул/мкм^2, 11.5 CY5 молекул/мкм^2.	< 0.5 молекул флуорофора/мкм^2 или 0.15 амоль (10^{-24} моля) меченого нуклеотида.	-	< 10 CY3 молекул/мкм^2	< 1 CY3 молекул/мкм^2
Программное обеспечение	Visage HDG	OptiQuant	ImaGene		ImageQuant 5/0 и ArrayVision	
Стоимость	US$ 60 000		US$ 40 000 – 80 000		US$ 110 000	US$ 50 000

ДНК или белков. Олигонуклеотидные пробы, комплементарные сегменту интересующего гена-мишени, иммобилизуются на микрошарах, которые имеют собственную флуоресцентную активность (рис.14). В качестве стандарта сравнения используются флуоресцентномеченные ДНК-зонды, комплементарные олигонуклеотидам, иммобилизованным на микрошарах. Микрошары и флуоресцирующие зонды гибридизуются в присутствии амплифицированной ДНК-мишени и затем анализируются. Наличие специфической последовательности в образце определяется конкурентной гибридизацией, которая оценивается при прохождении микрошаров через пучок лазерного света. Оптический детектор количественно определяет индивидуальные микросферы в реальном режиме времени, измеряет флуоресценцию каждой молекулы и параллельно идентифицирует микросферы, несущие эту молекулу. Данная технология позволяет анализировать более 100 проб в реальном режиме. Ее преимуществом является открытость системы, позволяющая исследователю самостоятельно подбирать олигонуклеотиды и ДНК-мишени для своих целей.

ДНК-чипы несомненно имеют несколько преимуществ перед другими традиционными молекулярно-биологическими подходами. Они технологичны, в них реализован принцип миниатюризации и дифференциального сиквенса анализируемой пробы. Особенностью ДНК-чипов является полная автоматизация рабочего места. Представляется важным,

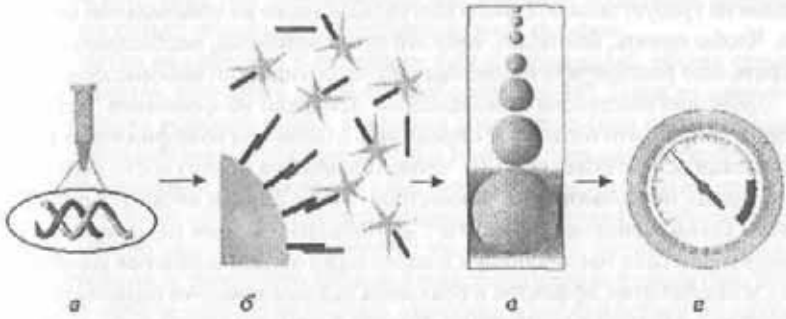


Рис. 14. Детекция сигнала на микрошарах компании Luminex. **а.** Амплификация ДНК мишени. **б.** Конкурентная гибридизация амплифицированной ДНК - мишени и меченного ДНК - зонда с микрошарами. **в.** Пропускание микрошаров через цитофлоориметр; **г.** Изменение флоресценции каждого микрошара.

что они могут быть использованы неоднократно (за исключением ДНК-чипов на гелевых подложках). В настоящее время ряд компаний уже предлагает коммерческие чипы. Например, компания Affymetrix предлагает на продажу 6 чипов для анализа экспресии генов (Hu6800 Set, Mu19K Set, Mu11K Set, Mu650 Set, Ye6100 Set, Test 1), один чип для анализа единичного нуклеотидного полиморфизма (HuSNP2K Assay) и 3 чипа для анализа мутаций и полиморфизма (HIV PRT Plus Assay, p53 Assay, CYP450 Assay). Компания Incyte Pharmaceuticals предлагает 10 ДНК чипов для изучения экспрессии генов. Российский центр биологических микрочипов, созданный в 1996 г. на базе Института молекулярной биологии, подготовил 4 чипа: для выявления точечных мутаций в b –глобиновом гене, коньюгативной мутации bcr/abl гена, полиморфизма HLA DQA1 аллелей и типирования бактерий.

Оптические сенсоры

Оптические биосенсоры являются открытыми системами, позволяющими исследователю изучать взаимодействие макромолекул. Основной отличительной особенностью их функционирования является возможность проводить наблюдения в реальном режиме времени (real-time), что позволяет не только регистрировать взаимодействие молекул, но и оценивать кинетические характеристики этого процесса. Важно, что реагирующие биомолекулы находятся в нативном состоянии, так как процедура регистрации не требует мечения зонда (лиганда), а также их специальной очистки. Чтобы понять, благодаря чему это стало возможно, необходимо предварительно рассмотреть принципы работы оптических биосенсоров.

Действие оптических биосенсоров основано на феномене "затухающих полей", что позволяет определять изменения коэффициента преломления вследствие событий, происходящих на поверхности сенсора, в пределах нескольких сот нанометров. Такие сдвиги являются результатом взаимодействия молекулы с иммобилизованным на поверхности рецептором (или последующей диссоциации образовавшегося комплекса), и оценка этих эффектов в реальном режиме времени позволяет определять константы связывания. В мире доступно лишь ограниченное количество таких коммерческих приборов: BIAcore (Уппсала, Швеция, http://www.biacore.com), Affinity Sensors (Кембридж, Англия, http://www.affinity-sensors.com), Artificial Sensing Instruments (ASI) (Цюрих, Швейцария). Приборы отличаются методом генерации затухающих по-

лей. Компания BIAcore использует поверхностный плазмонный резонанс (ППР). Лазерный пучок света, проходящий через призму, падает на поверхность, покрытую золотом (рис.15). Свет отражается от поверхности по всем направлениям за исключением критического угла. Лазерный пучок в этом направлении возбуждает плазмонную волну на поверхности металла, что и вызывает падение интенсивности отраженного света. Величина критического угла строго зависит от коэффициента преломления слоя, прилегающего к поверхности сенсора. Таким образом, оценивая изменения критического угла с течением времени, можно определить изменения, происходящие на поверхности сенсора. IAsys компании Affinity Sensors и BIOS –1 компании ASI также используют феномен затухающих полей для оценки поверхностных изменений, но генерируются они по-другому. В семействе приборов IAsys призма имеет слой с низким коэффициентом преломления, депонированным на слое с высоким коэффициентом преломления (резонансный слой). Это составляет единую волноводную структуру. Лазерный пучок света падает на призму под различными углами (на рис.15 показан только один угол падения). При всех углах падения света на призму происходит его полное внутреннее отражение от низкопреломляющего слоя. Существует только один уникальный резонансный угол, при котором часть лазерного света попадет в высокопреломляющий слой, в котором он может многократно отражаться и генерировать затухающие поля. В приборе компании ASI также реализован принцип волнового направления, но только используется дифракционная решетка.

Несмотря на различия в генерации затухающих полей, общая схема экспериментов одинакова для всех приборов (рис.16). Одна из взаимодействующих молекул, проба, связанная ковалентно (или нековалентно высокоафинной связью) с поверхностью сенсора, взаимодействует с молекулой-мишенью, находящейся в растворе. Используя сенсор для измерения изменения коэффициента преломления в реальном режиме времени, можно определить количество лиганда (ДНК-мишени) и «качество» сродства испытуемого лиганда к иммобилизованной пробе (рис.17). Как уже отмечалось выше, оценка кинетики взаимодействия является главным преимуществом данной технологии. Также сюда можно отнести небольшое количество образца и легкость управления приборами.

Первые устройства, которые были сконструированы для измерения молекулярных взаимодействий, в том числе и взаимодействий биологических макромолекул, появились в конце 80-х годов. В 1990 г фирма

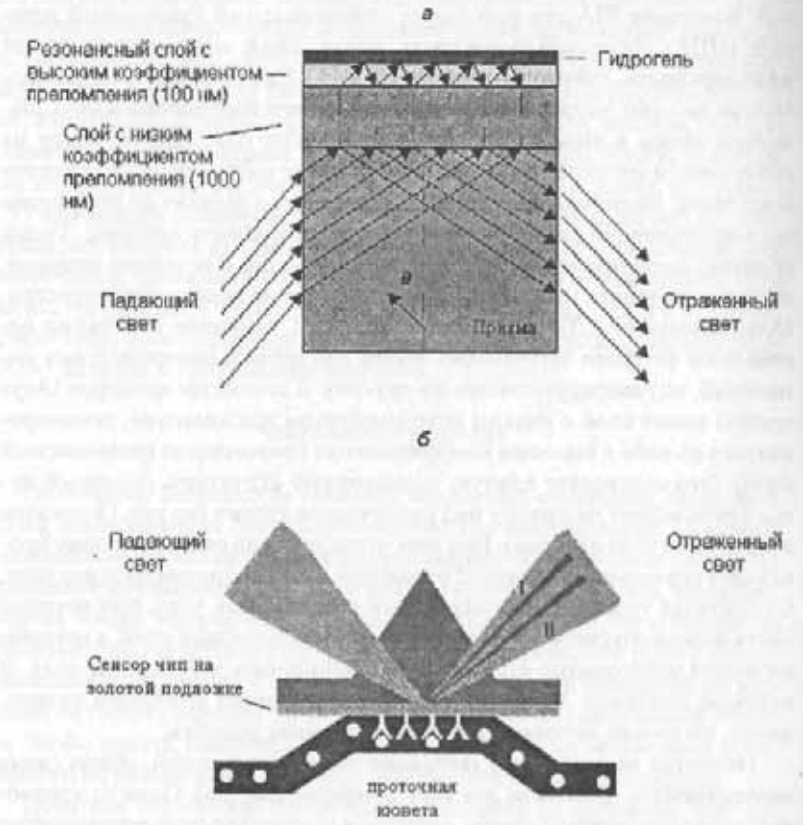


Рис. 15. Принципиальные оптические схемы приборов IAsys (а) и BIAcore (б)

BIAcore Inc (формально Pharmacia Biosensor) выпустила первый прибор для кинетических исследований взаимодействия лиганд-рецептор, антиген-антитело, а также для выявления иных взаимодействий между биологически активными макромолекулами. Устройства BIAcore являются лидерами на рынке научных приборов для проведения экспериментов по молекулярному узнаванию, в том числе гибридизации нуклеиновых кислот, и их внедрение в рутинную научную практику в разных странах мира происходит очень интенсивно. Чувствительность распознавания составляет 10^{-12}моль вещества и эквивалентна десяткам копий ДНК или РНК,

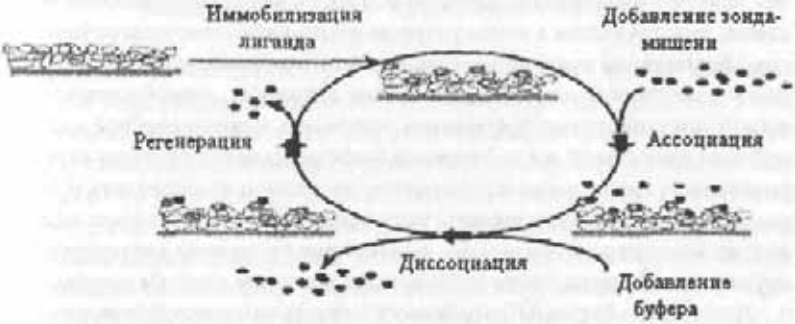


Рис.16. Схема экспериментального цикла на оптических биосенсорах

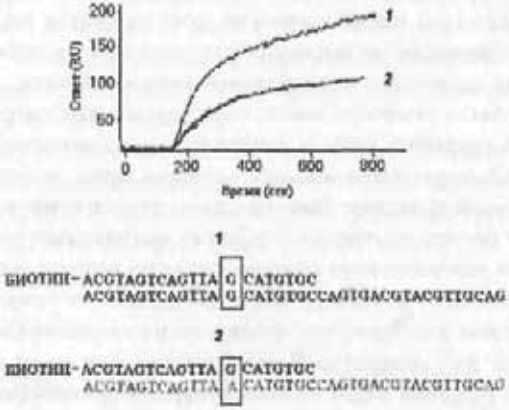


Рис. 17. Кинетика ДНК гибридизации, полученная на приборе Iasys.
На сенсоре иммобилизован олигонуклеотид длиной 20 нуклеотидов. Добавляется: 1) ДНК, полностью комплементарная иммобилизованному олигонуклеотиду; 2) ДНК, комплементарная иммобилизованному нуклеотиду, но несущая одну точечную мутацию.

участвующих в реакции гибридизации, ограничения по молекулярному весу реагирущих макромолекул >5000-6000Да. Эти устройства успешно применяются в экспериментальной фармакологии и иммунохимическом анализе, создавая серьезную конкуренцию по чувствительности, простоте и стоимости реагентов традиционным методам ELISA, RIA и т.д. Кюветы или биочипы, позволяющие проводить перечисленные выше измерения, представляют собой специально обработанные поверхности с рабо-

чей камерой над ними объемом 50-200 мкл с иммобилизованным веществом, участвующим в молекулярном взаимодействии: олигонуклеотидом, фрагментом нуклеиновой кислоты, антителом или антигеном, белком - рецептором или специфическим лигандом, иммобилизованной живой клеткой или ее фрагментом, например, плазматической мембраной или органеллой и т.д. Универсальность, наличие системы стандартизованных химических компонентов, позволяющих проводить присоединение к поверхности кюветы различных веществ, позволяет сделать анализ многопараметрическим, комбинируя различные характеристики изучаемых объектов, часто относящихся к разным классам соединений.

Английская фирма Affinity Sensors выпустила серию оптических биосенсоров IASys – IASys manual, IASys+, IASys auto. Приборы этой фирмы широко используются в аналогичных областях и имеют некоторые технологические и идеологические преимущества по сравнению с BIAcore, например, более высокую чувствительность, позволяющую регистрировать единичные молекулярные взаимодействия.

Как уже было отмечено выше, обе системы относятся к классу так называемых открытых гибких измерительных комплексов, предназначенных для быстрого и успешного решения задач, возникающих в рутинной научной практике. Вместе с тем следует отметить, что открытый дизайн систем измерения и обсчета получаемых результатов, наличие кювет для нанесения макромолекул по выбору экспериментатора в зависимости от поставленных задач делает эти устройства и кюветы кандидатами для быстрого эффективного создания биочипов, предназначенных для конкретных медицинских или иных практических целей и для решения задач по молекулярной диагностике в практике. Многие биотехнологические компании работают над созданием своих модифицированных кювет для медицины, сельского хозяйства, криминалистики, фармакологических исследований и т.д.

До сих пор нами рассматривалась различные методы ДНК-диагностики, основанные на амплификации и детекции нуклеотидной последовательности, интересующей исследователя. Между тем, с 1993 года активно начали разрабатываться технологии, в которых используются модифицированные нуклеиновые кислоты. Несомненным преимуществом таких подходов, является возможность контролировать степень специфичности связывания модифицированных зондов с ДНК- или РНК- мишенью. Одним из представителей таких олигомеров являются пептидные нуклеиновые кислоты.

Модифицированные нуклеиновые кислоты

ПНК или «Пептидные Нуклеиновые Кислоты» - являются новым классом информационных молекул, такими же, как ДНК или РНК, только сахарно-фосфатный остов заменен ациклической, ахиральной и незаряженной полиаминовой цепью (как правило, N- (2-аминоэтил) глицины) (www.cbr.imgh.ku.dk). На рис.18 приведена химическая структура ПНК и для сравнения ДНК. Необходимо заметить, что эти молекулы имеют одно и тоже количество химических связей между азотистыми основаниями (пиримидинами и пуринами). 5'- и 3'- концам ДНК соответствует амино - и карбокси- концы (N- и C-) ПНК. С химической точки зрения пептидная основа ПНК даже отдаленно не походит на ДНК или РНК. Однако, функционально, ПНК, как было показано, почти совершенно имеют те же свойства, что и нуклеиновые кислоты, например комплементарность оснований согласно постулату Уотсона-Крика, только характеризующиеся экстраординарной аффиностью и специфичностью.

ПНК зонды, которые содержат только пиримидиновые основания - тимин и цитозин связываются специфически с ДНК-мишенью, вытесняя некомплементарную цепь и таким образом формируя триплет, состоящий из 2 ПНК/1ДНК молекул. Связь в таких комплексах (ПНК-ДНК-

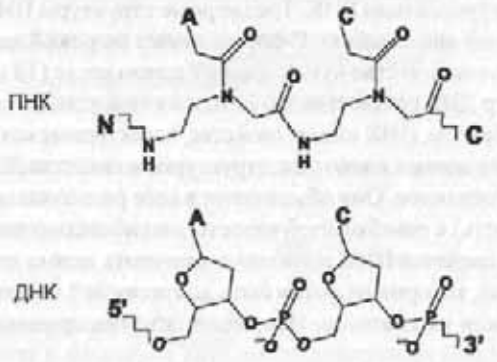


Рис. 18. Химическая структура ПНК.
Остов ПНК молекул состоит из повторяющихся N-(2-аминоэтил)глицинов. Азотистые основания (в данном примере аденин (A) и цитозин (C)) связаны с остовом через метилен карбонильную группу. ПНК не содержит никаких пентозных и фосфатных групп.

Таблица 4

Влияние ПНК на стабильность комплексов (Nature, 1993)

Дуплекс	T_m
ПНК/ДНК (15 пар нуклеотидов)	69^0 C
ДНК/ДНК (15 пар нуклеотидов)	54^0 C
ПНК/РНК (15 пар нуклеотидов)	72^0 C
ДНК/РНК (15 пар нуклеотидов)	50^0 C

Более стабильные ПНК/ДНК и ПНК/РНК дуплексы имеют более высокую температуру плавления. Условия эксперимента: 10 мМ фосфатный буфер, 0,1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, pH 7,0.

ПНК) более стабильна (табл.4) чем в ДНК-ДНК и поэтому обратное вытеснение некомплементарной цепью ДНК (не мишень) ПНК из комплекса невозможно. Это свойство связывания в литературе обычно обозначается как вытеснение цепи (strand-displacement) или внедрение дуплекса (duplex invasion). Интересно отметить, что гибридизация ПНК олигомеров с комплементарной ДНК не зависит от ионной силы раствора в силу нейтрального характера остова ПНК. В тоже время ПНК не деградируют под влиянием протеолитических ферментов, таких как нуклеазы или протеиназы, что делает их прекрасным антисмысловым агентом, т.е. специфическим ингибитором трансляции РНК. Трехмерные структуры ПНК комплексов образуют новый вид спирали, Р-форму, имеют широкий диаметр (28 А) и очень большое количество нуклеотидов в одном витке (18 пар). Для сравнения диаметр ДНК спирали около 20 А, а в витке находится 10 нуклеотидов. Таким образом, ПНК имеют свойства, характерные как для пептидов, так и для нуклеиновых кислот, т.е. структурные свойства ДНК и химические свойства пептидов. Они объединяют в себе распознавание ДНК (комплементарность) с ошибкоустойчивостью и гибкостью амидной химии. Уникальные свойства ПНК позволяют развивать новые направления их использования, которые не могли быть достигнуты с помощью традиционных ДНК или их аналогов. Некоторые из этих применений описаны ниже.

Увеличение эффективности амплификации VNTR локуса. ПЦР амплификация локуса вариабельных повторов (VNTR) - широко используемая техника в судебной медицине, установлении отцовства, а также в молекулярной биологической практике. Однако трудность выполнения дан-

ной методики ограничивала ее применение. Демерс в 1995 г. показал, что ПНК могут значительно увеличить эффективность ПЦР VNTR локуса. Было предположено, что проблема с ПЦР повторяющихся последовательностей связана с интер- и интра- гибридизацией цепей ДНК, вследствие чего предотвращалась амплификация длинных последовательностей. Когда ПНК олигомеры добавляются в ПЦР реакции, они гибридизуются с повторяющимися последовательностями только на одной цепи, предотвращая связывание с ней комплементарных ПЦР продуктов (рис.19). Длина ПНК олигомера подбирается таким образом, чтобы гарантировать, что полимераза может заместить ПНК в течение синтеза цепей.

Рис. 19. Модифицированная ПЦР VNTR локуса.

ПНК отжигаются и блокируют ДНК после денатурации матрицы (стадия 1). Может быть использован, как отдельный отжиг ПНК (78° С) (стадия 2), так и отжиг ПНК во время охлаждения ПЦР смеси до температуры отжига праймера (стадия 3). После отжига праймера, температура повышается и начинается синтез новых цепей ДНК (стадия 4), при этом ПНК молекулы вытесняются из матрицы полимеразой.

Оптимизация ДНК/РНК захвата. ПНК олигомеры могут эффективно использоваться, когда они связаны с твердой фазой. Возможно, использовать короткие последовательности (10-18 п.н.), чтобы захватить определенный ДНК или РНК фрагмент из сложной смеси. ПНК имеет существенно лучшую эффективность захвата и специфичность, чем ДНК (можно достигнуть дискриминации в одно основание). ПНК олигомеры могут быть связаны с твердой фазой несколькими способами. Шесть гистидиновых аминокислот могут быть связаны необратимо на колонке никель - NTA (Orum и другие.). Альтернативно, ПНК могут быть помечены биотином и затем связаны с парамагнитными частицами, на поверхности которых иммобилизованы молекулы стрептавидина. Возможно также захватывать активно транскрибируемые гены, содержащие повторы CAG (Boffa и другие).

Использование ПНК в генной терапии. Принцип антисмысловой генной терапии заключается в следующем. Матричная РНК (мРНК) выбранного гена блокируется короткими (15-20 п.н.) олигонуклеотидами или их аналогами с целью запрещения трансляции и таким образом синтеза белка. На основе использование фосфоротиоатов разработано более 10 антисмысловых лекарств, проходящих в настоящее время клинические испытания и для двух из них испытания, как ожидается, будут закончены в этом году. Хотя результаты пока очень многообещающие, существует общее мнение, что фосфоротиоаты будут скоро заменены антисмысловыми лекарствами второго и третьего поколения, которые основаны на различной химии остова ДНК. ПНК, развитие которых началось семь лет назад, рассматриваются как одни из самых многообещающих кандидатов на следующее поколение антисмысловых лекарств. Как уже отмечалось, они не деградируются нуклеазами и протеазами и не связываются с белками сыворотки. Кроме того, они обладают высокой степенью аффиности и специфичностью. ПНК/РНК дуплекс не является субстратом для РНКазы Н и, таким образом, способ действия будет отличаться от такового фосфоротиоатных олигонуклеотидов антисмыслового действия. Действие ПНК через связывание с нетранслируемыми регионами мРНК может полностью предотвратить трансляцию.

In situ гибридизация. ПНК могут идеально подходить для исследований, основанных на гибридизации, потому что они имеют более высокую специфичность, чем ДНК. Так как используются короткие последовательности для гибридизации, то ее специфичность значительно увеличивается.

Анализ полиморфизма отдельных (единичных) нуклеотидов. Технология, основанная на ПЦР, идентифицирует точечные мутации в один

шаг без анализа нуклеотидной последовательности ДНК и обычно используется, чтобы исследовать фрагмент ДНК на присутствие известной точечной мутации. Используется принцип так называемых зажимов. Например, *данная технология может определить, содержит ли фрагмент ДНК* дикий тип аллеля или мутантный аллель. В этом случае, синтезируется ПНК олигомер с комплементарной последовательностью к дикому типу (рис.20). ПЦР реакционная смесь содержит этот ПНК олигомер, фрагмент ДНК и два праймера. Один праймер комплементарен нуклеотидной последовательности мутантного аллеля, другой является общим обратным праймером. Во время ПЦР, ПНК олигомер (дикий тип) и мутантный ДНК *праймер конкурирует за гибридизацию с участком-мишенью. Мутантный* ДНК праймер будет связываться только тогда, когда существует точное соответствие мишени, то есть, когда цель – мутантный аллель. Соответственно, только в этом случае происходит амплификация ДНК.

Таким образом, из примеров приведенных выше, видно, что использование модифицированных нуклеиновых аминокислот в ДНК-диагностике может значительно повысить качество и надежность аналитических процедур.

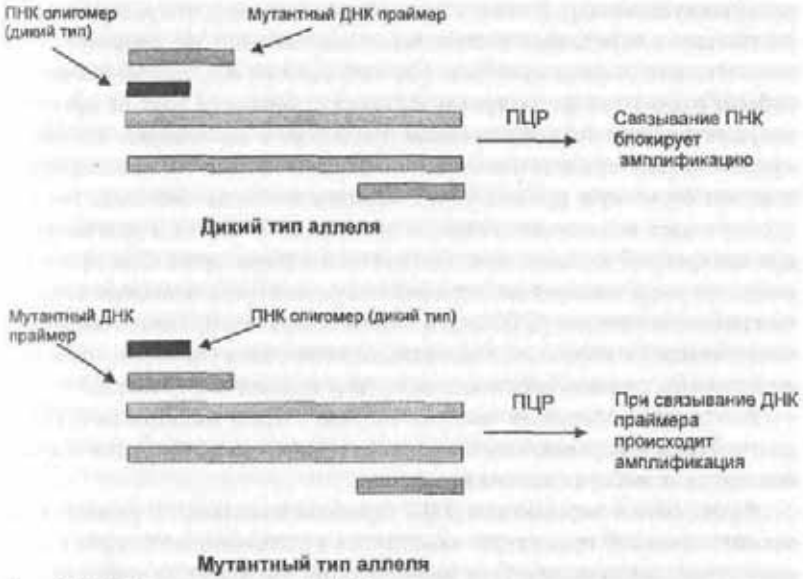


Рис. 20. ПЦР с использованием ПНК зажимов.

Некоторые технологические аспекты развития медицинской ПЦР-лаборатории.

Прошло около 10 лет с момента, когда в Российской Федерации были произведены первые медицинские анализы с использованием метода полимеразной цепной реакции. С тех пор внедрение методов ДНК-диагностики, и в первую очередь метода ПЦР, в медицинскую практику происходит очень интенсивно, несмотря на сложную экономическую ситуацию, отсутствие соответствующей системы контроля и несовершенство законодательной базы.

Проводя сравнительный анализ диагностических тест-систем, использующих метод ПЦР, следует отметить, что за последние пять лет существенно возросла их интегральность. Разработчики наборов постарались учесть многие рекомендации, возникшие в ходе использования отечественных тест-систем, и обеспечить качественную работу наборов, в основном за счет продуманного сочетания основных этапов анализа. ***Пробоподготовка, амплификация и анализ результатов*** проработаны в технологическом плане достаточно тщательно и составляют единую диагностическую систему. Вместе с тем, следует отметить, что развитие тест-систем шло в основном в экстенсивном направлении, не затрагивая технологические основы процесса. Многие, если не все, диагностические наборы различных фирм-производителей отличаются друг от друга по несущественным технологическим признакам и используют стандартную схему ПЦР-анализа клинического образца. Это, на наш взгляд, представляет серьезную проблему для медицинских пользователей, так как ограничивает возможность выбора оптимальной системы диагностики для конкретной клинико-диагностической лаборатории. Эти причины побудили нас в заключении этой работы рассмотреть основные тенденции развития методов ДНК-диагностики в стране и привлечь внимание пользователей к новым технологиям, позволяющим увеличить производительность, снизить стоимость анализа и поднять его качество.

Рассмотрим основные технологические стадии медицинской ДНК-диагностики и перспективы совершенствования каждой стадии в диагностических наборах нового поколения.

Выделение и экстракция ДНК (пробоподготовка). В рамках этой технологической процедуры наметились существенные сдвиги в сторону сокращения количества манипуляций, уменьшения времени, используемого на подготовку клинического образца, автоматизации про-

цесса пробоподготовки и снижение стоимости анализа. Характерной чертой нынешнего этапа развития методов пробоподготовки является внедрение отечественных оригинальных технологий, разработанных российскими учеными и технологами.

Идеальная процедура пробоподготовки, по нашему мнению, должна состоять из одного этапа, подразумевать под собой минимум манипуляций и обеспечивать надежный результат медицинского анализа вне зависимости от характера клинического образца. Одним из эффективных путей реализации этой технологии является возможность применения хроматографических методов очистки нуклеиновых кислот (обращенно-фазная, ионообменная, распределительная, гель-проникающая хроматография) для постановки ПЦР.

Их применение позволяет эффективно экстрагировать ДНК и РНК из образца, удалить часть ингибиторов реакции, редуцировать инфекционность материала для обеспечения безопасности медицинского персонала.

Альтернативным эффективным способом пробоподготовки является иммуносепарация инфекционных агентов с последующим выделением их нуклеиновых кислот. Использование специфических антител к микроорганизмам или клеткам-мишеням эукариотического происхождения, иммобилизованных на инертных частицах с магнитными свойствами, позволяет быстро и эффективно экстрагировать необходимое количество анализируемой матрицы без какой-либо дополнительной химической обработки материала. Преимуществом этого метода является возможность существенно увеличить соотношение между матрицей, используемой в амплификации, и неспецифическими фрагментами ДНК. Под эту технологию уже созданы первые автоматизированные устройства..

Амплификация. Основная тенденция в развитии этого этапа - применение новой аппаратной базы - амплификаторов (программируемых термостатов), имеющей более совершенные характеристики переходных температурных процессов, увеличенный ресурс работы, обеспечивающий значительное сокращение времени протекания реакции. Характерной чертой современных амплификаторов является возможность поддержки пробирочного, планшетного и других форматов амплификации в одном приборе.

В отношении дизайна амплификационных смесей следует обратить внимание на тенденцию применения мультипраймерной ПЦР, что увеличивает производительность и интегральность метода (возможность выявления большего количества патогенных микроорганизмов или иных определяемых признаков) и в перспективе будет иметь большое значение

при использовании в современных устройствах регистрации ДНК - биочипах.

Одним из перспективных направлений в модификации амплификационного этапа является разработка систем, реализующих «твердофазную» амплификацию. В таких системах один из олигонуклеотидных праймеров ковалентно иммобилизован на специально модифицированном слое пластика пробирки. Получаемые в ходе ПЦР ампликоны так же остаются иммобилизованными на твердой фазе, что исключает риск контаминаций и упрощает последующую процедуру их детекции.

В последнее время достаточно успешно реализуются количественные методы ПЦР-анализа. Количественный ПЦР-тест особенно необходим для диагностики и мониторинга некоторых вирусных заболеваний (вирусный гепатит С и В, СПИД). В то же время, переход на новый технологический уровень в пробоподготовке и амплификации неэффективен без адекватных разработок в части, касающейся регистрации результатов амплификации.

Регистрация результатов амплификации. В последнее время особенно много внимания уделяется модификации и модернизации методов регистрации результатов ПЦР. В целом можно выделить следующие принципиальные направления.

1) Внедрение систем, регистрирующих и анализирующих изображение геля в цифровом формате.

Это направление обусловлено применением в настоящее время, в подавляющем большинстве случаев, электрофоретического подхода в детекции продуктов амплификации. Широкий спектр устройств, позволяющих перевести изображение геля в цифровой формат, позволяет отказаться от фотодокументации результатов. Следует отметить, что являясь существенным техническим нововведением, данное направление не решает основных проблем развития. Одним из существенных недостатков является субъективность оценки данных, полученных в ходе электрофореза, что не позволяет значительно увеличить специфичность детекции в целом.

2) Гибридизационные методы регистрации результатов.

Применение гибридизационных технологий позволяет решать накопившиеся идеологические и технологические проблемы. В основе такого подхода лежит гибридизация амплифицированной ДНК со специфичным к определяемой последовательности меченым олигонуклеотидным зондом и последующая детекция гибридизационного комплекса. Приме-

нение гибридизационной схемы в детекции амплифицированной ДНК позволяет существенно повысить специфичность анализа, а планшечный формат выполнения делает возможным максимальную стандартизацию и автоматизацию процесса, что практически исключает субъективность оценки. В зависимости от типа метки, которой модифицирован олигонуклеотидный зонд (производные флуоресцеина, гаптены и т.п.), реализуются различные способы детекции гибридизационного комплекса (прямое измерение флуоресценции, иммуноферментный анализ).

При рассмотрении описанных подходов необходимо принимать во внимание, что современные гибридизационные системы детекции на микропланшетах по существу послужили прообразом при создании сверхсовременных и пока еще только экспериментальных модельных систем анализа ДНК–биочипов, принципы функционирования которых были описаны выше. Таким образом, переход медицинских пользователей к гибридизационному формату регистрации будет во многом способствовать и дальнейшему внедрению диагностических систем нового поколения.

Говоря о гибридизационных технологиях, следует отметить еще одно принципиально новое направление развития регистрационных систем, подразумевающее использование **оптических биосенсоров.** Эти устройства не требуют каких-либо модификаций ампликона или зонда и позволяют определять в ходе гибридизации в реальном режиме времени пикограммовые количества фрагментов нуклеиновых кислот, иммобилизованных на поверхности оптической кюветы. Свойства кюветы позволяют проводить несколько сотен определений на одной кювете с соответствующими циклами регенерации после каждого определения. Представляется актуальным использование таких устройств для количественного определения ампликонов.

В заключение нам хотелось бы обобщить рассмотренные выше тенденции развития медицинской ПЦР-диагностики. Объединение в единую технологическую схему современных подходов в детекции ДНК стало уже реальностью. В связи с этим, пожалуй, одним из главных направлений в развитии ДНК-диагностики видится создание и внедрение широкопрофильных ***ПЦР-лабораторий нового поколения.*** И такие современные диагностические системы нового поколения, на наш взгляд, должны характеризовать следующие качества:

1. Более высокая чувствительность и, главным образом, специфичность определения нуклеиновых кислот.

2. Максимальная автоматизация и, обусловленная этим, стандартизация большинства этапов анализа.

3. Уменьшение вероятности субъективной оценки результатов (за счет автоматизации и снижения роли человеческого фактора).

4. Высокая производительность системы при низкой себестоимости выполнения анализа.

5. Общее сокращение количества манипуляций в пределах каждого этапа анализа.

6. Компьютеризация этапов ввода и вывода данных анализов, совместимость с программным обеспечением по статистической обработке результатов.

Еще одним важным условием развития медицинских методов развития ДНК-диагностики является интеграция новейших достижений в этой области с традиционными методами анализа.

Развитие интерпретативной идеологической базы является актуальной медицинской и научной задачей и требует постоянного участия различных специалистов. Необходимо уже сейчас предпринимать усилия для создания специализированных научно-методических комплексов, где различные методы диагностики, такие как ПЦР, ИФА, бактериология, биохимия сосуществовали бы не как самостоятельные диагностические направления, а как единое диагностическое пространство, способное в каждой конкретной ситуации предложить оригинальное диагностическое решение и с наибольшей эффективностью решить поставленную задачу.

Комплексное внедрение новых диагностических схем ознаменует переход медицинской ДНК-диагностики на новый технологический уровень и позволит лабораторной службе России развивать и в дальнейшем это направление, не упуская передовых позиций, завоеванных на протяжении предыдущего десятилетия.

Заключение

Следующие столетие несомненно ознаменует интенсивное развитие биотехнологии. Быстрый рост технологического потенциала индустриальных и развивающихся стран обуславливает развитие, совершенствование и внедрение в клиническую практику новых методов исследования. К числу таких методов необходимо отнести и молекулярно-биологические методы исследования, выявляющие самые тонкие, кли-

нически неразличимые патологические отклонения от нормы, которые во многом предопределяют развитие заболевания. Амплификационные и гибридизационные технологии позволили уже на настоящем этапе поднять на качественно новый уровень диагностику многих инфекционных и генетических заболеваний. Внедрение миниатюрных многопараметрических анализаторов – биочипов сделает анализ многих патогенетических факторов исчерпывающим и абсолютно объективным. Вместе с тем, несмотря на впечатляющие успехи современной технологии и науки, искусство врача еще долгое время будет оставаться неотъемлемым компонентом успешного лечения

Рекомендуемая литература

ПЦР

Appenzeller T. 1990. Democratizing the DNA sequence., *Science*, Mar 2, 247(4946).

Arnheim, N. 1992. Polymerase Chain Reaction Strategy. *Annual review of biochemistry, vol.* 61. XIV+1359P. , p. 131-156.

Bugawan, T. L; Saiki, R. K; Levenson, C. H; Watson, R. W; Erlich, H. A. The Use of Non-Radioactive Oligonucleotide Probes To Analyze Enzymatically Amplified Dna for Prenatal Diagnosis and Forensic Hla Typing. *Bio-Technology*, 1988.

Erlich, H. A; Gelfand, D; Sninsky, J. J. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction., *Science*, 1991, v.252, n.5013, 1643-1651.

Erlich, H.A.; Gelfand, D. H.; Saiki, R. K. Specific DNA Amplification, *Nature*, 1988,Feburary 4, V. 331, 461-462

Higuchi R; Fockler C; Dollinger G; Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* N Y, Sep,1993, 11(9):1026-30.

Kinzler . W; Vogelstein B. Whole genome PCR: application to the identification of sequences bound by gene regulatory proteins. *Nucleic Acids Research*, 1989, May 25, 17(10):3645-53.

Mullis K. B; Faloona F. A; Scharf S; Saiki R. K; Horn G; Erlich H. A., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology,1986.

Mullis K. B; Faloona F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 1987, 155:335-50.

Saiki R, K.; Scharf S; Faloona F; Mullis K. B; Horn G. T; Erlich H. A.; Arnheim N., Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and

restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 1985, Dec 20, 230(4732):1350-4.

White T. J. The future of PCR technology: diversification of technologies and applications. *Trends Biotechnology*, 1996, Dec, 14(12):478-83.

White T. J; Madej R; Persing D. H. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Advances in Clinical Chemistry*, 1992, 29:161-96.

ЛЦР

Abravaya, K., Carrino, J. J., Muldoon, S., and Lee, H. H. Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR). *Nucleic Acids Research*.1995, 23:675-682.

Barany, F. . Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*,1991, 88:189-193.

Evans, D.A.P. "N-acetyltransrerase." In Pharmacogenetics of drug metabolism, edited by W. Kalow. 1992,New York: Pergamon.

Gibbs, R. A., Nguyen, P. N., and Caskey, C. T. Detection of single DNA base differences by competitive oligonucleotide priming. *Nucleic Acids Research*.1989, 17:2437-2448.

Grossman, P. D., Bloch, W., Brinson, E., Chang, C. C., Eggerding, F. A., Fung, S., Iovannisci, D. A., Woo, S., and Winn-Deen, E. S. High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation. *Nucleic Acids Research*. 1994, 22:4527-4534.

Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J. and Hood, L.. A ligase-mediated gene detection technique. *Science*. 1988, 241:1077-1080.

Nickerson, D.A., Kaiser, R., Lappin, S., Stewart, J., Hood, L., and Landegren, U. 1990. Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 87:8923-8927

Wu, D. Y., and Wallace, R. B. The ligation amplification reaction (LAR)–amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics*. 1989, 4:560-569.

Количественная ПЦР

Ferre, F. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Applic*.1992, 30:2576-2582.

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., and Gelfand, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction products by utilizing the 5'

to 3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.1991, 88:7276-7280.

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Will,. S., Saiki, R. K., and Gelfand, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5"to3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. *Clinical Chemistry*. 1992, 38:462-463.

Ikuta, S., Takagi, K., Wallace, R. B., and Itakura, K. Dissociation kinetics of 19 base paired oligonucleotide-DNA duplexes containing different single mismatched base pairs. *Nucleic Acids Research*.1987, 15:797-811.

Livak, K. J., Flood, S. A. J., Marmaro, J., Giusti, W., and Deetz, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications*.1995, 4:357-362.

Lyamichev, V., Brow, M. A. D., and Dahlberg, J. E. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science*. 1993, 260:778-783.

Wang, A.M., Mark, D.E. Quantitative PCR, p.70-75. In. M.A. Innis, D.H.Gelfand, J.J. Sninsky, White T.J. (ed.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. 1990, Academicpress, Inc., San Diego, Calif.

NASBA

Compton, J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* (London). 1991, 350: 83-85.

Fahy, E., D.Y. Kwoh, Jasmer D.P. Self-sustained sequence replication (3SR): an isotermal transcription-based amplification system alternative to PCR. *PCR Methods Applic*. 1991, 1:25-32.

Gingeras., T.R., Kwoh D.Y. In vitro nucleic acid targqt amplification techniques: issues and benefits. *Praxis Biotechol*.1992, 4: 403-429.

Gingeras, T.R., Prodanovich P., Latimer T., Guatelli J.C., Richman D.D., Barringer K.J. Use of self-sustained sequence replication amplification reaction to analyze and detect mutations in zidovudine-resistant human immunodefficiency virus. *J.Infect.Dis*. 1991, 164: 1066-1074.

Guatelli J.C., Gingeras T.R., Richman D.D. Nucleic acid amplification in vitro: detection of sequence with low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin.Microbiol.Rev*. 1989, 2:217-226.

Gutelli J.C., Whitfield K.M., Kwoh D.Y., Barringer K.M., Richman D.D., Gingeras T.R. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids

by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990, 87: 1874-1878.

SDA

Spargo et al. Detection of M. tuberculosis DNA using Thermophilic Strand Displacement Amplification. *Molecular and Cellular Probes* 1996, 10: 247-256.

Spargo et al. Simultaneous SDA and Fluorescence Polarization Detection, In Situ SDA. In Nonradioactive Detection of Biomolecules (2nd edition, C. Kessler, ed.), 1997,Chapters 15 & 23.5., Springer-Verlag.

Spears et al. Simultaneous Strand Displacement Amplification and Fluorescence Polarization Detection of Chlamydia trachomatis DNA. *Anal. Biochem*. 1997, 247: 130-137.

Walker and Little. Target Amplification Systems. In DNA Probes (G. H. Killer & M. M. Manak, ed.), 1993, Section 7, Stockton Press.

Walker et al. Isothermal amplification of DNA targets by Strand Displacement Amplification. In Nonradioactive Detection of Biomolecules (C. Kessler, ed.),1992, Chapter 4.2.3, Springer-Verlag.

Walker et al. A Chemiluminescent DNA Probe Test Based Upon Strand Displacement Amplification (SDA). In Molecular Methods of Virus Detection (D. L. Wiedbrauk, ed.),1995, Chapter 15, Academic Press.

Walker et al. A DNA Probe Assay Using Strand Displacement Amplification (SDA) and Filtration to Separate Reacted and Unreacted Detector Probes. *Molecular and Cellular Probes* 1995, 9: 399-403.

Walker et al. DNA Detection by Strand Displacement Amplification (SDA) and Fluorescence Polarization with Signal Enhancement Using a DNA Binding Protein. *Nucleic Acids Research*. 1996, 24: 348-353.

In Situ ПЦР

Aoyagi K. Application of in situ PCR to clinical pathology – detection of viral infection. *Rinsho Byory*. 1997, 45: 229-233.

Matsui H., Shiba R., Matsuzaki Y., Asaoka H., Hosoi S., Doi M., Ohno T., Tanaka N., Muto H. Direct detection of hepatitis B virus gene integrated in the Alexander cell using fluorescence in situ polymerase chain reaction. *Cancer Lett*. 1997, 24: 259-264.

Komminoth, P., Adams, V., Long, A.A., Roth,J. Evaluation of methods for hepatitis C virus (HCV) detection in liver biopsies: comparison of histology, immunohistochemistry, in situ hybridization, reverse transcriptase (RT) PCR and in situ RT PCR. *Path. Res. Pract*. 1994, 190: 1017-1025.

Komminoth, P., Long, A. In situ polymerase chain reaction. An overview of methods, applications and limitations of new molecular technique. *Virchows Arch.* 1993, B 64: 67-73.

Nuovo G.J., Lidonnici P., MacConnel K., Lane B. Intracellular localization of polymerase chain reaction (PCR) - amplified hepatitis C cDNA. *Amer. J. Surg. Pathol.* 1993, 17: 683-690.

Nuovo G.J., Gallery F., MacConnel P., Braun A. In situ detection of polymerase chain reaction-amplified HIV-1 nucleic acids and tumor necrosis factor-a RNA in central nervous system. *Amer. J. Pathol.* 1994, 144: 659-667.

ДНК-чипы

Blanchard, A.P. & L. Hood. Sequence to array: probing the genome's secrets. *Nature Biotechnology* 1996, 14:1649,

Ekins R. and Chu F.W., Microarrays: their origins and applications. *Trends in Biotechnolology*, 1999, 17, 217-218.

Dubiley S, Kirillov E, Lysov Y, Mirzabekov A. Fractionation, phosphorylation and ligation on oligonucleotide microchips toenhance sequencing by hybridization. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25:2259-2265.

Gruschin D, Yershov G, Zaslavsky A, Gemmell A, Shick V, Proudnikov D, Arenkov P, Mirzabekov A. Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA and protein microchips. *Anal Biochem*, 1997, 250:203-211.

Forozan, F.; Karhu, R.; Kononen, J.; Kallioniemi, A.; Kallioniemi, O. P. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends in Genetics*, 1997, 13, 405-409.

Lemieux, B., Aharoni, A., and M. Schena. Overview of DNA Chip Technology. *Molecular Breeding*, 1998, 4, 277-289.

Lipshutlz, R., Morris, D., Chee, M., Hubbell, E., Kozel, M., Shah, N., Shen, N., Yang, R., and Fodor, S. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *BioTechniques* 1996, 19:442-447

Marshall, A., and Hodgson. J. DNA chips: An array of possibilities. *Nature Biotechnology* 1998, 16: 27-31 ()

Ramsay, G. DNA chips - states-of-the-art. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(1), 40-44.

Sinclair, B. Everything's Great When It Sits on a Chip - A bright future for DNA arrays, *The Scientist*, 1999, May 24, 13(11), 18-20.

Schena, M., Heller, R.A., Theriault, T.P., Konrad, K., Lachenmeier, E., and Davis, R.W. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends in Biotechnology*, 1998, 16, 301-306.

Southern, E. DNA chips: analyzing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale. *Trends in Genetics* 1996, 12: 110-115

Wallace, R. W. DNA on a chip - serving up the genome for diagnostics and research. *Molecular Medicine Today*, 1997, 3, 384-389.

Оптические биосенсоры

Edwards P, Maule C, Leatherbarrow R, Winzor D: Second-order kinetic analysis of IAsys biosensor data: its use and applicability. *Anal Biochem*, 1998, 263:1-12.

Edwards P, Lowe P, Leatherbarrow R: Ligand loading at the surface of an optical biosensor and its effect upon the kinetics of protein-protein interactions. *J Mol Recognit*, 1997, 10:128-134.

Kamiuchi T, Abe E, Imanishi M, Kaji T, Nagaoka M, Sugiura Y: Artificial nine zinc-finger peptide with 30 base pair binding sites. *Biochemistry*, 1998, 37:13827-13837.

Lowe P, Clark T, Davies R, Edwards P, Kinning T, Yeung D: New approaches for the analysis of molecular recognition using Iasys evanescent wave biosensor. *J Mol Recognit*, 1998, 11:194-199.

Malmqvist M: BIACORE: an affinity biosensor system for characterisation of biomolecular interactions. *Biochem Soc Trans*, 1999, 27:335-340.

Merwee A: Determination of the affinity and kinetic constants for the interaction between human virus echovirus 11 and its cellular receptor, CD55. *J Biol Chem*, 1998, 273:30443-30447.

Myszka D, Jonsen M, Graves B: Equilibrium analysis of high affinity interactions using BIACORE. *Anal Biochem*, 1998, 265:326-330.

Myszka D, He X, Dembo M, Morton T, Goldstein B: Extending the range of rate constants available from BIACORE: interpreting mass transport-influenced binding data. *Biophys J*, 1998, 75:583-594.

Stockley P, Baron A, Wild C, Parsons I, Miller C, Holtman C, Baumberg S: Dissecting the molecular details of prokaryotic transcriptional control by surface plasmon resonance: the methionine and arginine repressor proteins. *Biosens Bioelectron*, 1998, 13:637-650.

Schuck P, Millar D, Kortt A: Determination of binding constants byequilibrium titration with circulating sample in a surface plasmon resonance biosensor. *Anal Biochem*, 1998, 265:79-91.

Strandh M, Persson B, Roos H, Ohlson S: Studies of interactions with weak affinities and low-molecular-weight compounds using surface plasmon resonance technology. *J Mol Recognit*, 1998, 11:188-190.

ТЕХНИЧЕСКОЕ ОСНАЩЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ: РЕАЛИЗУЕМЫЕ ПРИНЦИПЫ, СЛОЖИВШИЕСЯ ТЕНДЕНЦИИ, ПРЕДВИДИМЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Техническая составляющая технологического прогресса в клинической лабораторной аналитике

Техническое оснащение современных клинических лабораторий является итогом длительного и многостороннего процесса, причем каждый из этапов этого процесса в том или ином виде находит отражение в реальном оснащении лабораторий и сегодня. В то же время общий прогресс науки и техники постоянно проявляется в технических новшествах, находящих рациональное применение в практике клинической лабораторной аналитики.

Исторически сложилось так, что техническое (приборное и аппаратное) оснащение лабораторной работы развивалось параллельно с ее технологическим совершенствованием. Выше уже приводились примеры инициирующей роли изобретения микроскопа и колориметра в становлении клинической лабораторной аналитики и диагностики как самостоятельной сферы научной и практической медицинской деятельности. Технические новинки в ряде случаев становились основой для внедрения в лабораторную аналитику новых эффективных технологий, поскольку без этих приборов и устройств сама технология не могла быть осуществлена. Так, принцип поляризации флуоресценции, используемый для определения лекарственных и ряда других соединений в биоматериалах, был освоен клиническими лабораториями только с появлением прибора, позволяющего измерять эту характеристику. С другой стороны, расширение диапазона видов лабораторных исследований, имеющих приборное оснащение, шло рука об руку с прогрессом самой лабораторной медицины как

сферы научного знания и аналитики, и создание соответствующего прибора служило условием использования того или иного научного предложения на практике. Приборы разрабатывались в ответ на возникший в лаборатории метод, для его более быстрого и более стандартизованного выполнения. Таков, например, генезис всей гаммы приборов для обеспечения методов специфического связывания. Все более широкое внедрение в практику молекулярно-биологических методов обеспечено разработкой и производством всех необходимых для проведения полимеразной цепной реакции и других технологий этого рода приспособлений и устройств, вплоть до автоматического прибора «COBAS Amplicor», предложенного фирмой «Hoffman la Roche» (Швейцария).

Клиническая лабораторная аналитика широко пользовалась в своем техническом оснащении приборами, хорошо зарекомендовавшими себя в других отраслях науки и техники, приспосабливая их для решения собственных аналитических проблем. Так появились в арсенале клинических лабораторий многие электрохимические измерительные устройства, хроматографы, радиометры, масс-спектрометры. При этом шел отбор приборов, способных воспроизводить наиболее точные и информативные аналитические процедуры. Так, высокопроизводительный жидкостный хроматограф дает более точные результаты, чем, скажем, бумажная хроматография с элюированием и последующей фотометрией элюатов пятен разделенных веществ.

В конструировании лабораторного оборудования сказывается одновременно несколько (иногда противоречивых) тенденций, отражающих как направления и достижения научно-технического прогресса, так и разнообразие форм организации и условий лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов . Среди этих тенденций:

а/ расширение аналитических и диагностических возможностей клинических лабораторий за счет внедрения принципиально новых приборов и технологий;

б/ реализация аналитических принципов и технических решений, обеспечивающих наряду с более высокой чувствительностью и специфичностью детекторов, т.е. с наиболее точным определением искомого аналита, устойчивость результатов измерения и их регистрации; цель - повышение аналитической надежности исследований;

в/ создание комплексных многоцелевых лабораторных приборов; цель - консолидация различных аналитических возможностей, ускорение процесса лабораторного обследования пациента;

г/ роботизация, автоматизация, компьютеризация применительно как к отдельным аналитическим процедурам, так и ко всему клинико-лабораторному процессу в целом; цель - сокращение доли ручного труда и, следовательно, потребности в лабораторном персонале, сокращение расхода времени на выполнение анализов, повышение точности исследований за счет уменьшения человеческих источников ошибок, рационализация организации лабораторий и всего процесса лабораторной аналитики и диагностики;

д/ миниатюризация аналитических устройств; цель - сокращение расхода биоматериала и реагентов, ускорение процесса анализа, уменьшение потребности в лабораторных помещениях;

е/ создание технических условий возможности приближения процесса анализа к месту обследования и лечения пациента, в том числе вне лаборатории (в известной мере, в противовес тенденции укрупнения и автоматизации лабораторий);

ж/ интеграция всей информации относительно деятельности лаборатории, результатов выполняемых исследований, возможных влияющих на результаты факторов преаналитического, аналитического и постаналитического характера, контроля качества исследований и т.п. в единой лабораторной информационной системе;

з/ создание устройств и приспособлений для обеспечения связи (в том числе, on line) с внешними потребителями лабораторной информации - больничной информационной системой, больничными отделениями, поликлиниками; для включения в системы телемедицины, в телеконсилиумы и т.д.

Таким образом, наряду с воздействием общего научно-технического прогресса, существенное влияние на разнообразие парка лабораторной техники оказывают потребности рационального обеспечения клинико-лабораторной диагностики в различных условиях оказания медицинской помощи населению: на дому, в амбулаторных условиях, в стационаре общего профиля, в специализированном клиническом учреждении. Важными определяющими факторами являются особенности клинической задачи (скрининг, диагностика, мониторинг), характер и темп развития патологического процесса (критическое состояние, хронический процесс), на нужды эффективного лечения которого преимущественно ориентирована аналитическая технология, в которой используется то или иное оборудование.

Наконец, доминантой нынешней ситуации в здравоохранении вообще и в клинической лабораторной аналитике, в частности, является необходимость при решении задач технического оснащения сочетать клиническую эффективность с экономической рациональностью.

Таким образом, **общая направленность усовершенствования** технического оснащения КДЛ, как и их методического оснащения, состоит *в обеспечении наибольшей клинической информативности и аналитической надежности при сокращении времени оборота биоматериала и лабораторной информации о его содержимом и составе, т.е. срока между назначением анализа врачом и получением им результата исследования.*

Экономическая составляющая также принимается во внимание, однако, на наш взгляд, следует иметь в виду не только(и, может быть, не столько) прямую экономию лабораторных расходов, сколько интегральный экономический эффект, создаваемый (в результате участия лаборатории) более быстрой и более точной диагностикой патологии у пациента, более правильным выбором и применением лечебных мер, достижением в наиболее короткие сроки наилучшего результата лечения и качества жизни пациента.

Базовое техническое оснащение лабораторных технологий

Традиционно лабораторное дело складывалось как рукотворное занятие, в котором отдельные процедуры должны были обеспечиваться специально для них предназначенными устройствами и приспособлениями.

Оборудование клинической лаборатории можно разделить на несколько типов соответственно назначению и конструктивным особенностям.

А. Оборудование и расходные материалы для взятия и первичной обработки биоматериала.

Иглы (различного диаметра, в т.ч. двусторонние); скарификаторы, трепаны.

Стекла предметные и покровные.

Пробирки: обычные, центрифужные, вакуумные, с различными антикоагулянтами и консервантами, с разделительным гелем, с косым агаром.

Чашки Петри.

Флаконы для сбора мочи.

Посуда для сбора проб кала.

Устройства для концентрации проб мочи, спинно-мозговой жидкости.

Устройства для концентрации проб кала при поиске яиц гельминтов, цист и ооцист простейших.

Контейнеры для транспортировки проб биоматериал, в том числе изотермические.

Несмотря на кажущуюся примитивность этих приспособлений, они выполняют весьма важную функцию, поскольку от условий взятия материала в значительной мере зависят конечные результаты исследования (см. раздел «Управление качеством»). Выше уже упоминались вакуумные пробирки, производимые различными фирмами. Они существенно ускоряют процесс взятия крови, а значит, и уменьшают влияние длительного пережатия вен на содержание аналитов в венозной крови. Фирмы, производящие оборудование для анализа газов крови, предлагают устройства, обеспечивающие защищенное от интерференции компонентов воздуха взятие проб артериальной и венозной крови для анализа газов и pH. Так, фирма «AVL» рекомендует при использовании любого газоанализатора применять AVL COMBI sampler, внутренняя поверхность которого покрыта гепарином. Шприц позволяет быстро набирать точную порцию крови, что особенно важно при взятии артериальной крови. AVL Microsampler служит простым и безопасным приспособлением для атравматичного взятия пробы артериальной крови, в котором артериальное давление приводит к автоматическому наполнению капилляра (рис. 1). Эффективным приспособлением для быстрого (30 - 50 мин.) и точного (100%-ное открытие белка) концентрирования проб биожидкостей (мочи, спинномозговой жидкости), концентрирования антител, быстрого диализа биопроб может служить Pressure Urine Concentrator («Intersep»).

Б. Пробоподготовительное оборудование общего назначения.

Мерная посуда: пипетки, мерные цилиндры и колбы

Дозирующие устройства: полуавтоматические пипетки, дозаторы механические и электронные, диспенсеры, дилюторы, в том числе многоканальные, программируемые.

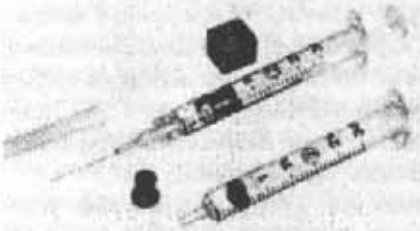


Рис. 1. Приспособления для взятия крови на анализ ее газового состава («AVL»).

Встряхиватели.

Мешалки магнитные и механические.

Весы различных типов (будучи измерительными приборами, весы используются в современной лаборатории преимущественно для подготовки реактивов, если в этом есть необходимость, для калибровки некоторых приспособлений, а не для измерения содержания аналитов)

Холодильники.

Бани водяные

Инкубаторы

Термостаты.

Автоклавы.

Стерилизаторы

Центрифуги различных типов и размеров: гематокритные, настольные, напольные, ультрацентрифуги, с охлаждением.

Аппараты для дистилляции, деионизации и очистки воды.

Воронки, фильтры.

Устройства для фиксации и окраски мазков, цитологических препаратов.

Устройства для автоматического разлива сред в пробирки и чашки Петри.

Посуда для выращивания культур бактерий с различными средами.

Пробоподготовительные автоматизированные системы

Системы для промывки микропланшетов: ручные, автоматизированные.

Посудомоечные машины: дезинфекционно-моечные, ультразвуковые.

Насосы вакуумные водоструйные или масляные.

Материалы о многих видах оборудования этой группы приводились в разделах «Элементы лабораторной работы» и «Основные лабораторные технологии и оборудование». Следует упомянуть также об устройствах, обеспечивающих необходимый температурный режим на преаналитическом этапе и в процессе анализа. При транспортировке и хранении проб чаще всего необходима низкая температура. Этой цели служат транспортные холодильники-контейнеры для проб, которые представляются непременным условием эффективной деятельности централизованных лабораторий, в которые пробы биоматериала доставляются нередко из отдаленных медицинских учреждений. Большая часть аналитов может сохраняться некоторое время в холодильниках, обеспечивающих постоянную температуру до + 5°С. Некоторые аналиты могут сохраняться лишь при более низких температурах: -20 °С, - 35°С, -70°С, что требует специальных морозильников.

Полярные по отношению к предыдущей группе температурные условия создают стерилизаторы, функция которых высокотемпературным

воздействием подавить активность микрофлоры и уничтожить ее споры на стенках лабораторной посуды многоразового использования, на металлических предметах, в питательных средах и пр. Теоретические основы стерилизации - см. в работе В.Л. Мунблит и др. (1985). Требования к методам и средствам стерилизации медицинского оборудования и материалов установлены отраслевым стандартом ОСТ 42-21-2-85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения», который, однако, не охватывает в полной мере все потребности стерилизации предметов, используемых в клинической лабораторной аналитике. Стерилизация паром под давлением обычно выполняется в устройствах, именуемых автоклавами, где создается избыточное давление пара. При этом должно быть обеспечено с помощью специальных насосов или способом «текучего пара» по возможности более полное удаление воздуха, который в силу своей малой теплопроводности мешает достижению наиболее эффективного прогрева стерилизуемых объектов. В зависимости от вида объектов стерилизации применяются различные комбинации давления, температуры и времени их воздействия. Так, для изделий из металла, стекла, резины, текстиля, а также для культур спорообразующих бактерий применяется давление порядка 2,0 кг/см^2, температура 132 °С в течение от 20 до 90 мин (последнее - для бактериальных культур). Питательные среды и растворы обрабатываются при давлении 0,5 - 1,1 кг/см^2 и температуре 110-120 °С в течение 15-30 мин. В отечественных лабораториях чаще всего используются электрические автоклавы с вертикальным или горизонтальным расположением камеры, производимые заводом медоборудования в Тюмени. Стерилизация сухим жаром применяется в отношении предметов, которые не должны стерилизоваться паром (жиры, масла, коррозируемые металлы, тонкий фарфор, термостойкие пластики, шприцы). Обработка сухим жаром обычно требует применения более высокой температуры (до 160 - 180 °С) и несколько более длительного времени (от 60 до 150 мин), а с учетом времени на разогрев и охлаждение - до 2-4 часов. Сухожаровые стерилизаторы (шкафы сушильно-стерилизационные) выпускаются заводами в Тюмени, Касимове, Ульяновске, Москве. Для обеспечения заданных условий стерилизаторы должны быть оснащены соответствующими контрольно-измерительными устройствами - термометрами, манометрами, таймерами, а в современных моделях - устройствами программирования всего режима стерилизации. Кроме того применяются химические средства контроля стерилизации, т.е. вещества, меняющие свое агрегатное состояние или цвет при

воздействии определенной температуры. Предпочтительны термоиндикаторы, которые меняют свой цвет при воздействии определенной температуры в течение определенного времени, т.е. они характеризуют выполнение всей программы стерилизации. Термоиндикаторы, выпускаемые НПФ «ВИНАР» в своем наименовании содержат параметры температуры и стерилизационной выдержки, для подтверждения воздействия которых они предназначены (например, ИС 121/10 предназначен для контроля паровой стерилизации при температуре 121 °С в течение 10 мин., а ИС 160/150 - для контроля сухожаровой стерилизации при температуре 160 °С в течение 150 мин). Наиболее надежный способ контроля - бактериологический, проводимый с помощью дисков из фильтровальной бумаги или кружков из фольги, содержащих высушенные споры Bacillus stearothermophilus для контроля паровой стерилизации и Bacillus licheniformis для контроля сухожаровой стерилизации, требует более длительного времени для получения заключения - до семи дней.

Наконец, промежуточную зону шкалы температур обеспечивают различные нагревательные устройства (жидкостные, суховоздушные и сухие), используемые в процессе лабораторного анализа. В клинических лабораториях часто используются водяные бани различной конструкции, представляющие собой емкости для подогреваемой до определенной температуры воды. Для этих устройств важна регулируемость температуры, ее стабильность, быстрота нагрева и охлаждения, возможность использования реакционных сосудов различной емкости. Современные водяные бани управляются встроенными микропроцессорами и могут обеспечивать стабильность температуры в пределах ±0,01°С. Нередко они совмещены с устройствами для встряхивания и перемешивания растворов, что способствует более быстрому и равномерному протеканию реакции (рис. 2). Вибротермостат ВТ-1 отечественного производства предназначен для термостатирования и перемешивания при проведении реакций в микропланшетах.

В. Оборудование, сочетающее функции разделения, детекции и измерения.

Установки для электрофореза, в т.ч. на твердом носителе (бумаге, мембране), геле, капиллярные, высоковольтные с охлаждением камеры.

Колонки для хроматографии: металлические, стеклянные

Хроматографы: газовые, жидкостные, ионообменные с различными типами детекторов, в т.ч. хроматографы-масс-спектрометры.

Б. Оборудование для визуального наблюдения и регистрации структур и изображений.

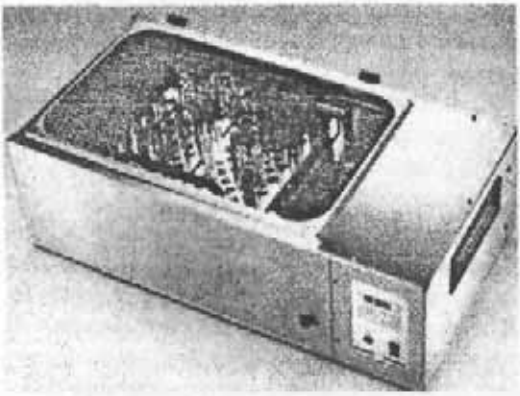


Рис. 2. Водяная баня - встряхиватель («Gebruder Haake GmbH»)

Микроскопы: монокулярные, бинокулярные, флуоресцентные, лазерные, стереомикроскопы; микроскопы «пространственного изображения»; оснащенные устройствами для фото- и видеорегистрации изображений, для передачи изображений на расстояние; роботизированные.

Трансиллюминаторы и денситометры для просмотра и чтения электрофореграмм, тонкослойных хроматограмм, фиксации и хранения их изображений.

Устройства для подсчета колоний микроорганизмов на чашках Петри.

Д. Измерительные приборы

а/ оптические

Фотометры

Спектрофотометры

Флуорометры

Люминометры.

Нефелометры, в т.ч. лазерные

Турбидиметры

Пламенные фотометры

Атомно-абсорбционные спектрофотометры.

Отражательные фотометры.

Вертикальные фотометры (ридеры)

Денситометры.

Ридеры штрих-кодов

б/ электрохимические

Полярографы.

Кондуктометры.

Потенциометры.
Кулонометры.
Ион-селективные электроды.
в/ радиометрические
Бета-счетчики.
Гамма-счетчики.
Твердокристаллические.
Жидкостно-сцинтилляционные.
г/ основанные на иных принципах
Урометры.
Поляриметры.
Осмометры
Вискозиметры
Рефрактометры.
Агрегометры.
Термометры.
Е. Оборудование для отдельных специальных процедур.
Устройства для определения скорости оседания эритроцитов
Термоциклеры (для полимеразной цепной реакции)

Большинство из упомянутых в пунктах В, Г, Д, Е приборов детально рассмотрено в разделе «Основные лабораторные технологии и оборудование», поскольку сам технологический процесс тесно связан с устройством этих приборов.

При налаживании соответствующей методики исполнитель метода оснащает свое рабочее место из этого набора предметов, которыми должна располагать лаборатория. При относительно небольшом арсенале методов исследования и малых сериях однородных анализов этот способ технического оснащения лабораторной работы удовлетворяет потребности и лаборатории, и обслуживаемого ею медицинского учреждения. этот способ бытует и сейчас в небольших поликлиниках и больницах.

Поскольку каждое из этих устройств и приспособлений необходимо для выполнения какого-то этапа подготовки пробы или ее анализа, набор таких моноцелевых устройств является базальным для всех последующих технических усовершенствований.

Комплексное оснащение и механизация лабораторных технологий

Примерно с конца сороковых годов XX века потребности клинической медицины в лабораторной информации стали прогрессивно возрас-

тать, что было вызвано как все более успешным применением традиционных лабораторных тестов при широком круге патологических состояний, так и появлением новых методов исследования, в особенности клинико-химических (электрофорез белков сыворотки крови, хроматография аминокислот, исследования ферментов при ряде патологических состояний, гормональные исследования), а затем и иммунологических. В *этих условиях в клинической лабораторной аналитике возникла потребность* в повышении интенсивности труда за счет работы с большими сериями одинаковых анализов, что логически привело к идее механизации однородных аналитических процессов: отмеривания проб и реагентов, одновременного центрифугирования, термостатирования и встряхивания серий пробирок, последовательного серийного измерения результатов проб при одних и тех же оптических условиях (Рис. 3). На этом этапе возникли разнообразные технические варианты механических устройств, предназначенных для ускорения и стандартизации условий выполнения отдельных этапов аналитического процесса. Первоначально это привело к *частичной механизации* лабораторных технологий. Естественным развитием этого процесса стала *комплексная механизация* лабораторного труда, которая облегчалась сходными аналитическими потребностями методов исследования близких групп аналитов: метаболитов, некоторых белков, ферментов. Механизация лабораторного труда существенно снижает расходы на выполнение отдельного анализа (рис. 4).

Принципы частичного или комплексного механизированного технического оснащения близких по своим принципам аналитических технологий сохраняют свою жизнеспособность и в настоящее время. При этом происходит не просто составление в ряд известных ранее устройств, предназначенных для выполнения последовательных этапов аналитического процесса, но и используются новые методические варианты, а встроенные микропроцессоры придают каждому из этих устройств высочайшие технические свойства на современном уровне требований, придавая им качества полуавтоматических систем пробоподготовки или анализа. Это позволяет использовать комплексы таких устройств как при рациональном оснащении средних по масштабам работы лабораторий для выполняемых в них традиционных методов, так и для внедрения в практику новейших методических приемов, например, для различных вариантов методов специфического связывания, для молекулярно-биологических методов.

В качестве примеров обновленных технико-аналитических решений можно указать на наборы модифицированных и усовершенствованных

Рис. 3. Принципиальная схема процедур аналитического процесса при механизации

Рис. 4. Сравнительная экономичность ручной, частично и полностью механизированной лабораторной работы (по Bosslet et al., 1977) в расчете на 1 лаборанта и 1 прибор. По оси абсцисс - число проб в день, по оси ординат - стоимость одного анализа. Нижняя кривая - ручная работа (цифровой фотометр и микролитровая система). Средняя кривая - частичная механизация (цифровой измерительный комплекс). Верхняя кривая - полностью механизированная аналитическая система.

приспособлений и устройств для таких рутинно применяемых лабораторных тестов, как определения скорости оседания эритроцитов, гематокрита и групп крови.

Казалось бы, нет более простого и легкого для выполнения теста, чем определение скорости оседания эритроцитов по Вестергрену: набери в мерный капилляр крови из пальца пациента, поставь в штатив и через час запиши результат. А между тем только за последние годы для ускоренного, механизированного или даже автоматизированного выполнения этого исследования предложено несколько видов устройств. « Diesse Diagnostica Senese»(Италия) предлагает Vesmatic system - устройство для одновременного определения скорости оседания эритроцитов в 60 пробах по 1 мл крови, содержащихся в пластиковых вакуумных пробирках VACUTEC, в которых обеспечены равные условия выполнения исследования за счет автоматического и гомогенного смешивания и измерения результатов, которые хорошо коррелируют с результатами референтного метода по Westergren. (Рис. 5)

Устройство Ves-static µ16 («Hospitex Diagnostics», Италия) позволяет провести определение скорости оседания эритроцитов еще быстрее - в пределах 8-15 мин. (Рис.6). Наконец, «Invitech Ltd» (Англия) предлагает прибор ESR PLUS (рис. 7), который, будучи оснащен центрифугой и лазером, способен определить скорость оседания эритроцитов одновременно в трех пробах капиллярной крови объемом 25 мкл каждая всего за 3 мин. (за последующие три минуты с помощью этого прибора может быть определен гематокрит, содержание общего билирубина, а также оценено наличие липемии и гемолиза).

Рис. 5. Автоматизированное устройство для микрометода определения скорости оседания эритроцитов VESMATIC system («Diesse», Италия).

Исследование гематокрита также предлагается оснастить специальным набором оборудования. Heraeus Biofuge Haemo - центрифуга, предназначенная преимущественно для определения гематокрита в 24-местном роторе для гематокритных капилляров, может быть оснащена ридером, который, будучи помещен на ротор непосредственно после центрифугирования, позволяет немедленно определить величины гематокрита (рис. 8). Такое же сочетание центрифуги CritSpin, располагающей 12-позиционным ротором и считывателя величин гематокрита Hematocrit Reader представляет компания «Internatinal Remote Imaging Systems» (со-

Рис. 6. Набор устройств для быстрого определения скорости оседания эритроцитов Ves-static μ16 (Hospitex Diagnostics, Италия).

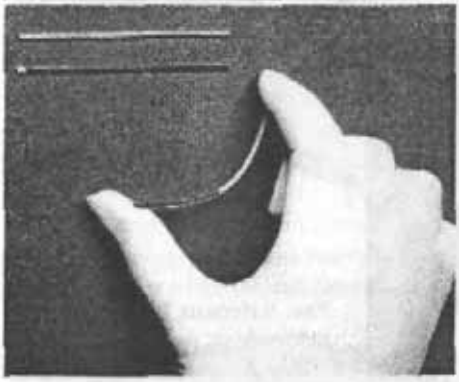
Рис. 7. Анализатор ESR PLUS («Invitech Ltd», Англия) для быстрого определения скорости оседания эритроцитов, а также гематокрита, общего билирубина, детекции гемолиза и липемии.

кращенно «IRIS», США) как Spun Microhematocrite System.(рис. 9а) Для определения требуется 2 минуты. Система может быть дополнена стеклянными или пластиковыми микрогематокритными капиллярами, как необработанными, так и гепаринизированными (рис. 9б).

Комплексное оснащение практикуется и компаниями, стремящимися внедрить своеобразный принцип исследования на эксклюзивной основе. Так, «Sanofi Pasteur» (Франция), предлагая новую гелевую технологию для определения групп крови Scan Gel, состоящую в использовании оригинальных карточек Скангель, каждая из которых включает 6 микропробирок, содержащих прозрачный полиакриламидный гель с определенными иммунными компонентами. В микропробирках карточки для определения групп крови AB0/RH содержатся специфические моноклональные антитела, соответственно, A- B- AB- D - DCE -Контроль.; в микропробирках карточки для определения ауто- и аллоантиэритроцитарных антител (прямая и непрямая реакция Кумбса) содержится гель с полиспецифической антиглобулиновой сывороткой (с зеленым окрашиванием) и т. д. (рис. 10 а). После добавления образца биоматериала и соответ-

Рис. 8. Heraeus Biofuge haemo - центрифуга, оснащенная 24-местным ротором для гематокритных капилляров и специальным считывателем результатов непосредственно с ротора после завершения центрифугирования. При использовании 24-местного микролитрового ротора, рассчитанного на пробирки объемом 1,5 и 2 мл, может быть использована в других аналитических технологиях.

а



б

Рис. 9. Комплекс устройств для определения величины гематокрита. а) специализированная центрифуга CritSpin и увеличительное стекло с осветителем для детекции результатов непосредственно на роторе. б)стеклянные и пластиковые капилляры для исследования гематокрита («IRIS», США).

ствующих готовых реагентов согласно предписанной для каждого из видов исследований процедуре может быть произведена инкубация (если необходимо) и центрифугирование в предлагаемых фирмой специально разработанных для использования карточек Скангель (по 24 карточки одновременно) инкубаторе и центрифуге. (Рис. 10 б). Результаты реакции определяются или визуально, или с помощью специального считывателя, оснащенного каруселью на 24 карточки, камерой высокого разрешения и программным обеспечением под Windows 95, производящего считывание результатов за 3 мин. 30 сек.

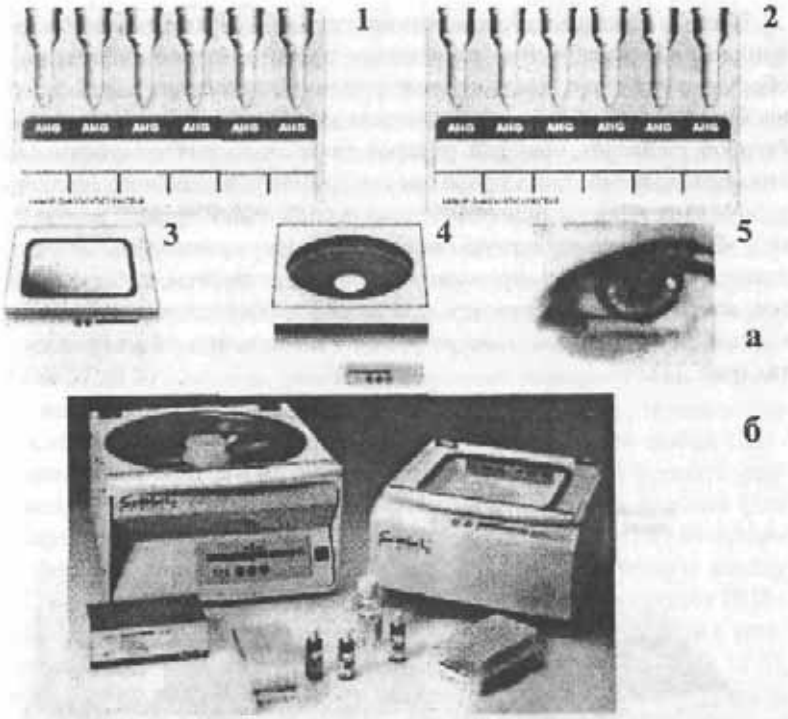


Рис. 10. Комплекс приспособлений и приборов для гелевой технологии определения групп крови ScanGel («Sanofi Pasteur», Франция).

а) Пример применения карточки Скангель для определения ауто- и аллоантиэритроцитарных антител (прямая и непрямая реакции Кумбса). Карточки Скангель. Кумбс aHTrigG, C3d (АГС). Микропробирки содержат гель с полиспецифической антиглобулиновой сывороткой (зеленым окрашиванием). Для идентификации антиэритроцитарных антител в одной сыворотке необходимы две карточки.

Эритроциты. Готовые реагенты: - Скан Панель, - СканСел I - II - III. Для аутоконтроля, пробы на совместимость или реакции Кумбса: 1 мл СканЛисс +10 мкл суспензии эритроцитов. Реагенты. СканЛисс.

Выполнение теста. 1. Добавьте в каждую микропробирку по 50 мкл соответствующей суспензии эритроцитов СканПанель. 2. Добавьте в каждую микропробирку по 25 мкл сыворотки (исключая прямую реакцию Кумбса). 3. Инкубируйте 15 мин, при 37°С. 4. Центрифугируйте 10 мин. 5. Считайте результаты.

б) Приборы для оснащения технологии СканГель: Центрифуга на 24 карточки с частотой вращения 900 об/мин.; Инкубатор на 24 карточки с контролируемой температурой 37°С.

Широкие диагностические возможности иммунохимических методов привлекли внимание многих мощных производителей лабораторного оборудование, что привело к появлению многочисленного семейства разнообразных устройств для выполнения этих методов: пипетторов, инкубаторов, шейкеров, вошеров, ридеров для выполнения иммунохимических исследований. Здесь приводим как пример комплексного оснащения рабочих мест для иммунохимических исследований предлагаемую фирмой «Bio-Rad» комплектную систему для иммунохимии, включающую диспенсер, инкубатор, промыватель, ридер, планшеты, наборы реагентов, контрольные материалы и программное обеспечение, а также полностью автоматизированное устройство для анализа на микропланшетах (рис. 11).

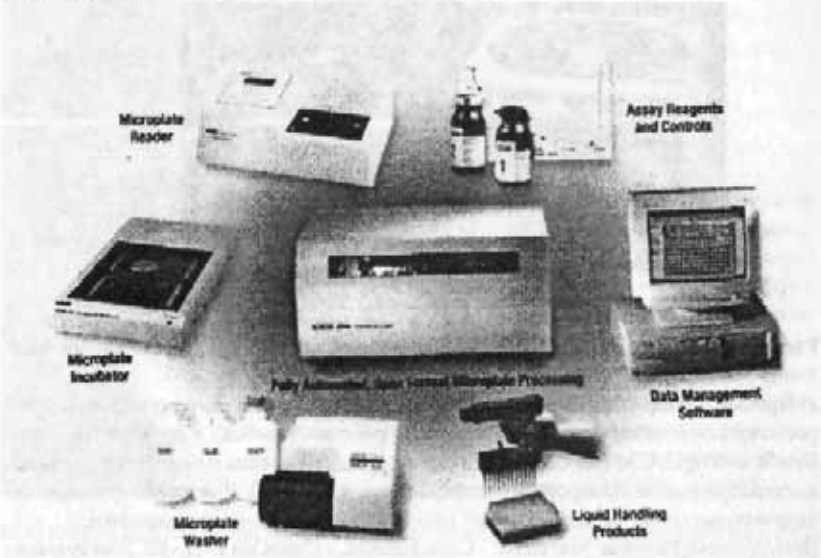


Рис. 11. Комплексное оснащение для ручного, полуавтоматического и автоматического выполнения исследований на микропланшетах фирмы «Bio-Rad». Против часовой стрелки: Ридер для микропланшет, инкубатор для микропланшет, промыватель для микропланшет, 12-канальный ручной дозатор, компьютер с программным обеспечением для управления процессом исследования на микропланшетах, реагенты и контрольные материалы; в центре : полностью автоматизированное устройство для проведения исследований на микропланшетах любого формата.

Понятно, что внедрение таких аналитических новаций, как молекулярно-биологические методы исследования, требующих гораздо более высокой культуры и технического уровня оснащения рабочих мест, чем ранее применявшиеся в клинических лабораториях технологии, связано со специфической приборной оснасткой. Комплектное оборудование фирмы «Bio-Rad» для ПЦР-лаборатории включает: набор для подготовки образцов ДНК «Инста Джен Матрикс», изготовленный на основе специально разработанных смол, адсорбирующих ингибиторы ДНК-полимеразы, фрагменты РНК, белки и др. компоненты, способные необратимо связать молекулы ДНК в процессе пробоподготовки; амплификатор «Джен Сайклер» на 24 образца с контролируемым диапазоном температуры от 37 до 97 градусов, диапазоном времени реакции 99мин. 59 сек., возможным объемом реакционной смеси от 10 до 150 мкл.; термоциклер «Ай-Сайклер» (рис. 12 а), способный адаптироваться для любой ПЦР-методики и для работы с микропланшетами 60-луночного формата (рассчитанного на пробирки объемом 0,5 мл), 96-луночного формата (для пробирок на 0,2 мл, стрипов и стандартных микропланшет) и 384-луночного формата, а также с ПЦР-слайдами; электрофоретическую ячейку Саб Селл БТ, с помощью которой возможно разделение продуктов ПЦР - от 8 до 120 образцов одновременно - за 15 - 90 мин, с прозрачной в ультрафиолете подложкой для геля с флюоресцентной линейкой (рис. 12 б); компьютерную систему для количественного анализа окрашенных гелей и документирования результатов «Гель Док 2000» (рис. 12в), состоящую из темного бокса с ультрафиолетовым трансиллюминатором, видеокамеры для связи с компьютером и программного пакета «Квонтити Уан», обеспечивающего анализ видеоизображения с количественным представлением и распечаткой результатов; цифровую фотодокументирующую систему «Диги Док» для фотосъемки окрашенных гелей и получения изображений, окрашенных бромистым этидием, цифровая фотокамера позволяет передать полученное изображение в компьютер для количественного анализа с помощью упомянутого выше программного обеспечения . Комплект оборудования LCx System для оснащения небольших молекулярно-биологических лабораторий, состоящий из пробоподготовительного устройства, термоциклера и анализатора, использующего технологию иммуноанализа с микрочастицами, мечеными олигонуклеотидными зондами с иммунореактивными гаптенами, для детекции результатов, предлагает фирма «Abbott».

Рис. 12. Комплексное оснащение для проведения полимеразной цепной реакции фирмы «Bio-Rad»: а) Термоциклер «Ай-Сайклер», адаптируемый для любых модификаций ПЦР-реакции.б) Электрофоретическая ячейка «СабСеллГТ», в) компьютерная система «ГельДок 2000» для количественного анализа окрашенных гелей и документирования результатов [темный бокс с ультрафиолетовым трансиллюминатором (302 нм), видеокамера (область визуализации от 4x5 см, чувствительность измерения до 0,1 нг двух цепей ДНК в полосе, окрашенной бромистым этидием); компьютер с программным обеспечением «Квонтити Уан» для автоматической идентификации полос, накопления слабого сигнала, определения размеров фрагмента и количества ДНК в образце с использованием наборов калибраторов,количественного расчета и графического представления результатов анализа на дисплее и в распечатке].

Автоматизация в клинической лаборатории

От комплексной механизации шаг в сторону *автоматизации* ряда аналитических процедур оказался совершенно естественным. Поскольку, как это показано выше, в процессе развития средств механизации лабораторных работ отдельные этапы лабораторных процедур оснащались соответствующими автоматизированными устройствами, которые затем

использовались по отдельности либо объединялись последовательно в единую аналитическую систему усилиями лабораторного работника (полуавтоматическая система), оставалось лишь решить проблему создания непрерывного пути исследуемой пробы, подобно конвейерному производственному процессу, вдоль цепи автоматизированных устройств, которые сопрягались бы воедино в качестве блоков монолитного аналитического прибора в полностью автоматизированную систему.

Ключ к решению проблемы непрерывного пути исследуемого материала по всем этапам аналитического процесса - от дозирования пробы до получения результата исследования, был найден в 50-е годы XX века, когда практически параллельно были выдвинуты идеи автоматизации лабораторных тестов путем измерения аналитов в потоке исследуемой биожидкости:для гематологических исследований на основе проточного кондуктометрического метода цитометрии, т.е. подсчета числа клеток крови и измерения их объема(Coulter), а для биохимических исследований - путем последовательного анализа проб биоматериала в постоянном потоке жидкости, представляющей смесь пробы с реагентами в системе капиллярных трубок (Skeggs). Если в дальнейшем развитии приборного парка гематологических автоматических анализаторов кондуктометрический принцип, хотя и дополненный некоторыми другими способами измерения свойств клеточных элементов (см. раздел « Методы исследования клеток»), сохранился как основной до настоящего времени, конструирование биохимических анализаторов развивалось по нескольким направлениям.

Предложенная Skeggs концепция была реализована фирмой «Technicon». «AutoAnalyser», основанный на этом принципе (рис. 13), был представлен не только в одноканальном варианте, где пробы анализировалась лишь в отношении одного компонента, но и в виде многоканальных (2-; 6-;12-канальных) приборов, позволявших исследовать одну и ту же пробу параллельно по нескольким параметрам. Это были **последовательные, проточные, одно- или многоканальные** автоматические анализаторы.

Как *моноцелевые автоанализаторы*, т.е. предназначенные для автоматического выполнения исследования только одного аналита (например, глюкозы), так и *многоканальные* приборы, способные исследовать несколько видов аналитов с помощью сходных методических приемов, открыли новую эпоху в организации лабораторного обслуживания, сделав возможным не только полное и быстрое удовлетворение численно

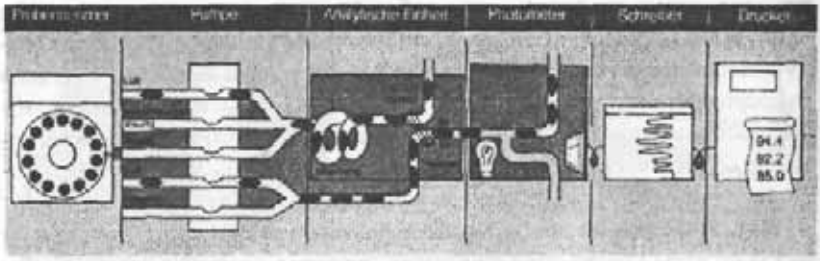


Рис. 13. Принципиальная схема устройства автоматического биохимического анализатора проточного типа (по Bosslet et al., 1977). Слева направо: пробонакопитель; насос (сверху вниз: воздух; раствор детергента, предотвращающего прилипание материала пробы к стенкам трубок; проба; воздух, реагенты); аналитический блок (слева направо: смешивание, диализ, горячая баня); фотометр; писчик; цифропечать

возросших потребностей клиницистов в лабораторных исследованиях в учреждениях любой мощности, но и став технической основой крупных централизованных лабораторий. Применение средств автоматизации аналитической работы в клинической лаборатории радикально повысило производительности труда сотрудников и ускорило выполнение аналитических процедур, уменьшило возможность появления аналитических ошибок, вызванных усталостью или небрежностью лаборантов.

Последующие поколения лабораторных автоматов были основаны на различных технических принципах и конструктивных схемах.

Концепция **дискретных** анализаторов, в которых каждая проба помещалась в отдельный континуум, куда затем поступали необходимы для реакции реагенты (рис. 14) была реализована во многих вариантах, и, пожалуй, стала основной в ныне действующем парке лабораторных автоматических анализаторов.

Концепция **центрифужного** анализатора совместила в себе последовательность, дискретность и параллельность анализа одновременно, поскольку в отдельные бороздки ротора одновременно вносились доли одной и той же пробы, реагенты для выполнения одного и того же анализа, выполнявшегося параллельно в процессе вращения ротора (рис. 15 а,б).

Важным свойством многих современных автоматических анализаторов является **селективность**, т.е. способность выполнять для каждой исследуемой пробы те анализы, которые назначены клиницистом и введены соответствующей командой (В первом поколении анализаторов

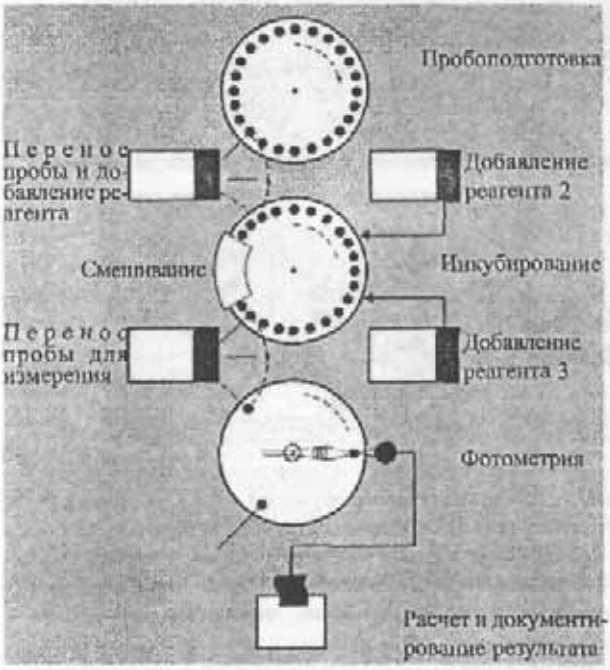


Рис. 14. Принципиальная схема устройства автоматического биохимического анализатора дискретного типа (*по Bosslet et al.*, 1977). Сверху вниз: Пробоподготовка; Инкубирование; Фотометрия; Расчет и документирование результатов. Слева направо: 1. Перенос пробы и добавление реагента 1. 2. Добавление реагента 2. 3. Смешивание. 4. Перенос пробы для измерения. 5. Добавление реагента 3.

фирмы «Technicon» каждая проба подвергалась всем исследованиям, которые были предусмотрены конфигурацией прибора). Не менее ценным качеством некоторых автоматических приборов является возможность выполнения вне очереди экстренно необходимых исследований пробы, полученной от пациента, находящегося в критическом состоянии (**свободный доступ**).

Отдельные блоки автоматизированных аналитических систем для клинико-биохимических исследований выполняют следующие этапы лабораторного анализа:

1/ Идентификация образца биоматериала
2/ Обработка образца
3/ Перенос образца и его распределение
4/ Удаление белка и других интерферентов
5/ Отмеривание пробы, ее перенос и распределение
6/ Хранение реагентов
7/ Отмеривание реагентов, их распределение

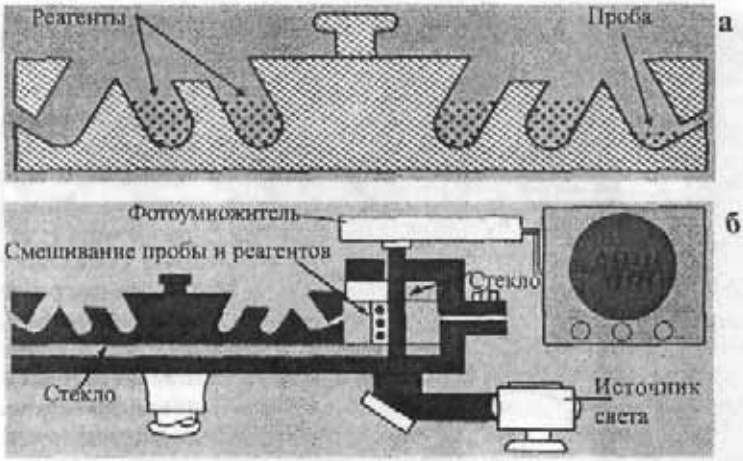


Рис. 15. Принципиальная схема устройства и процесса исследования на автоматическом биохимическом анализаторе центрифужного типа (по Bosslet et al., 1977). а) Схема размещения реагентов и пробы в лунках ротора. б) Схема устройства ротора и измерительного устройства. Слева направо : Стеклянная пластина в дне ротора. Смешивание пробы с реагентами. Стеклянное окошко. Источник света. Фотоумножитель и регистрирующее устройство.

8/ Фаза химической реакции

9/ Измерение результата реакции

10/ Обработка сигнала и хранение данных.

Идентификация образца биоматериала необходима для безусловного опознания его на всех этапах аналитического процесса и отнесения полученного результата анализа к обследуемому пациенту. Каждому образцу присваивается порядковый номер, который кодируется тем или иным образом, принятым в данной лаборатории. Этот код должен быть нанесен на пробирку с образцом.

Наиболее распространен штриховой код, широко используемый для регистрации отдельных изделий и товаров в промышленности и торговле. Определенные сочетания штриховых линий соответствуют порядковым номерам образцов. Метки с штрих-кодами могут заготавливаться заранее и присваиваться образцам по мере поступления их в лабораторию. Наряду с этим, существует возможность изготовления меток с помощью ручных печатающих устройств непосредственно в месте взятия материала у пациента. Метки с штрих-кодами наклеиваются на пробир-

ки с образцами, а также могут ими маркироваться упаковки реагентов, используемых в аналитическом процессе. Заложенная в них информация считывается предназначенными для этого устройствами («световыми карандашами», лазерными штрих-ридерами)(Рис.16). В настоящее время существует несколько систем штрих-кодов (Code 39, Code 93, Code 128, Interleaved 2 of 5, NW 7, Codabar Alphanumeric) и поэтому необходимо удостовериться в соответствии возможностей ридера по отношению к штрих-коду, используемому производителем маркированных пробирок и упаковок реагентов. Для целей контроля или для быстрого размещения образцов, подлежащих внеочередному анализу, на метках должна быть маркировка, понятная лабораторному работнику.

Среди вариантов способов идентификации - пробирки с колпачками разного цвета для дифференциации различных видов образцов (с гепарином, с теми или иными консервантами), причем код образца может быть нанесен на колпачок; контейнеры с кодами, нанесенными непосредственно на стенку пробирки; недавно предложенный «матричный код», который позволяет уплотнить закодированную информацию и может быть нанесен на различные части контейнера с образцом; наконец, специальные держатели для пробирок с вмонтированными в них электронными запоминающими устройствами, куда при взятии образца у пациента заносится вся необходимая информация, включая паспортные данные, локализацию пациента в лечебном учреждении и назначенную врачом программу лабораторных исследований. Считывающие устройства для «матричного кода», для электронных чипов отличаются своим устройством от лазерных штрих-ридеров.

Рис. 16. Считыватель штрих-кодов, нанесенных на пробирки с пробами биоматериалов и контейнеры с реагентами.

Необходимость предварительной **обработки образца** до начала анализа существует в отношении определения аналитов, которые обычно исследуются в плазме или сыворотке крови. Автоматизация центрифугирования образцов крови непосредственно в моноблочном анализаторе затруднительна. Поэтому обращено внимание на разработку способов более быстрой обработки образцов крови до их введения в анализатор. В настоящее время известны два таких способа. Один из них представлен устройством для центрифугирования пробирок с цельной кровью вокруг их продольной оси, что позволяет за одну минуту получить безтромбоцитарную сыворотку или плазму. Другой способ состоит в центрифугировании вакутейнеров (фирма «Becton Dickinson») или вакуумных пробирок иного производства в центрифуге Autospin без предварительного их уравновешивания, что позволяет отделять жидкую часть крови от клеток менее, чем за три минуты. Предлагается использовать тот или другой способ на входе образцов в лабораторию перед автоматическими анализаторами.

Для исследований, в которых анализируется цельная кровь, этап обработки образцов излишен.

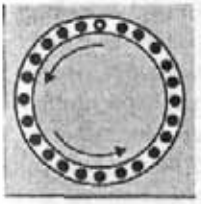
Детали устройств для тех или иных операций с образцами (как и на последующих этапах - с пробами биоматериалов) представляют собой роботизированные аналоги приспособлений, используемых при ручном выполнении анализов.

Поступившие в анализатор образцы в приборах ряда конструкций затем подвергаются сортировке, т.е. группировке по виду исследований, которые должны быть выполнены с содержащимся в них материалом. Это необходимо в многопараметровых анализаторах. Для такой сортировки в конструкцию анализатора включается соответствующее устройство, обладающее способностью распознавать информацию, содержащуюся в кодах пробирок с образцами, и распределять пробирки по видам исследований. Такие сортирующие устройства (сортеры) могут быть как самостоятельным лабораторным прибором, так и одним из компонентов аналитической системы. Сортеры могут быть различной пропускной способности - от нескольких десятков до тысяч пробирок в час.

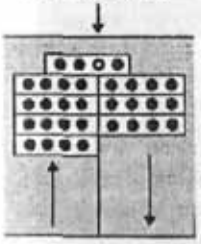
Поступившие в автоматический анализатор образцы биоматериалов перемещаются внутри прибора, чтобы оказаться в зоне действия тех или иных устройств, выполняющих необходимые для обработки, дозирования и распределения проб образца процедуры. Это перемещение осуществляется с помощью продвижения конвейерной цепи, кассет с пробирками или вращения диска, в отдельных ячейках которых находятся сосу-

ды, содержащие образцы (Рис. 17). При различных конструктивных решениях в анализаторах может размещаться от нескольких десятков до сотен образцов. Поскольку процесс передвижения образцов занимает некоторое время, предпринимаются усилия для предотвращения испарения жидкости из сосудов, содержащих образцы. Чаще всего это достигается сохранением колпачков, закрывающих сосуды с образцами. При достижении пробиркой с образцом зоны дозирования образца на отдельные порции необходимо снять копачок, что выполняется соответствующим роботизированным устройством.

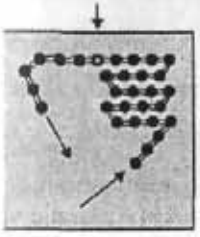
Из пробирки, в которой образец был доставлен в лабораторию, должны быть взяты порции сыворотки или плазмы для выполнения отдельных анализов. При этом используются пробирки небольшого объема, рассчитанные на размещение в них необходимого для анализа количества исследуемой жидкости и реагентов. Их конструкция должна способствовать минимизации т.наз. «мертвого» объема, т.е. избыточного количества жидкости, нужного лишь для того, чтобы взятое для измерения результата анализа количество жидкости было не меньше требуемого. Эти «вторичные» пробирки могут быть многоразового пользования, что требует их мытья, одноразовыми, что требует их утилизации после употребления, или могут формироваться в самом приборе по мере необходимости (автоматический анализатор Dimension, фирма «Dade») (рис.18) . Материал, из которого изготавливаются эти сосуды, не должен содержать компонентов, способных влиять на ход реакции.



Взятие пробы



Взятие пробы



Указанные выше операции - сортировка образцов, откупоривание пробирок и дозирование отдельных порций образца (аликвот) - могут быть объединены в одном комплексе, представляющем собой самостоятельный пробоподготовительный прибор, готовящий пробы для нескольких анализаторов. Выше (см. раздел

Рис. 17. Варианты устройств для размещения и перемещения пробирок с образцами биоматериалов в автоматических биохимических анализаторах дискретного типа (сверху вниз): вращающийся диск; перемещение кассет с пробирками; цепь с пробирками.

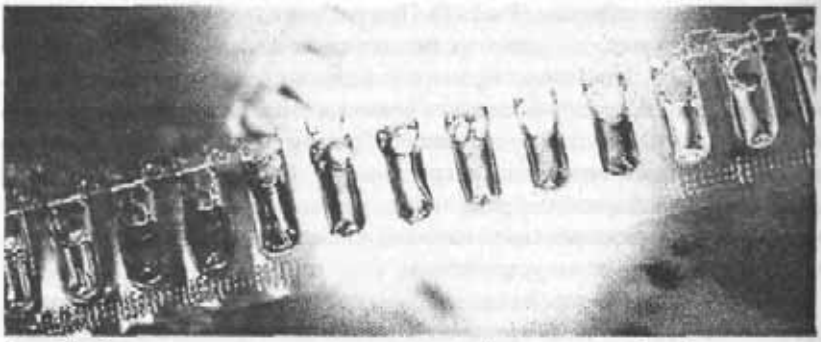


Рис. 18. Формирование реакционных емкостей в самом приборе (анализатор Dimension XL, фирмы «Dade»).

«Элементы лабораторной работы») упоминалось автоматическое устройство для пробоподготовки Multiprobe (фирма «Packard») способное обрабатывать от 300 до 1700 проб за час. На борт устройства можно одновременно загрузить до 1000 пробирок или 32 микропланшета. Предел дозировки - 50 микролитров. Считывающее приспособление распознает до 256 штрих-кодов за 90 сек. Дальнейшим развитием этой системы стала роботизированная система для обработки жидких проб биоматериалов MultiPROBE II, которая предоставляет широкие возможности для приспособления к различным методическим потребностям, включая миниатюризацию технологий и молекулярно-биологические методы.

Это достигается:

- за счет модульной конструкции прибора, допускающей встраивание блоков для расширения емкости, для охлаждения сосудов различной формы и объема с помощью ледяной бани или рециркуляции, для процедур пробоподготовки к ПЦР-реакции и определения последовательности оснований в ДНК (термоциклер, точное дозирование до 1 мкл, использование 384-луночных планшетов для термоциклера);

- за счет конструкции дозировочного плеча робота, позволяющей обслуживать не только центральную часть прибора, но и периферийные добавочные модули;

- за счет системы пипетирования, допускающей дозирование проб и реагентов в диапазоне от миллилитров до нанолитров;

- за счет обеспечения высокой воспроизводимости определения точки дозирования до 50 мкм, что необходимо для точного дозирования в 384-луночные микропланшеты;

- за счет применения технологии Accusense, позволяющей определять уровень жидкости до 50 мкл в микропланшетах;

- за счет использования программного обеспечения WinPREP, позволяющего гибко переходить к различным протоколам обработки проб (рис. 19).

Дальнейшим шагом в автоматизации пробоподготовки стали полностью автоматизированные пробоподготовительные комплексы, производимые различными фирмами.

Автоматизированный пробоподготовительный комплекс Genesis FE 500 («Abbott Diagnostics», «TECAN AG»)выполняет все необходимые действия в процессе пробоподготовки образцов биоматериалов (Рис. 20). Поступивший в лабораторию образец биоматериала идентифицируется с пациентом в соответствии со штриховым кодом, нанесенным на контейнер с образцом, из образца отбирается материал для предварительной обработки. Для того, чтобы это могло быть осуществлено, прибор снимает крышки с вакуумных пробирок фирм «Becton Dickinson», « Sarstedt», «Greiner». Пробы автоматически загружаются во встроенную в прибор центрифугу с охлаждением, подвергаются центрифугированию. Проверяется объем пробы и качество биоматериала на предмет наличия желтушной окраски, гемолиза и липемии. Автоматически кодируются штриховым кодом и размещаются в пробонакопителе вторичные пробир-

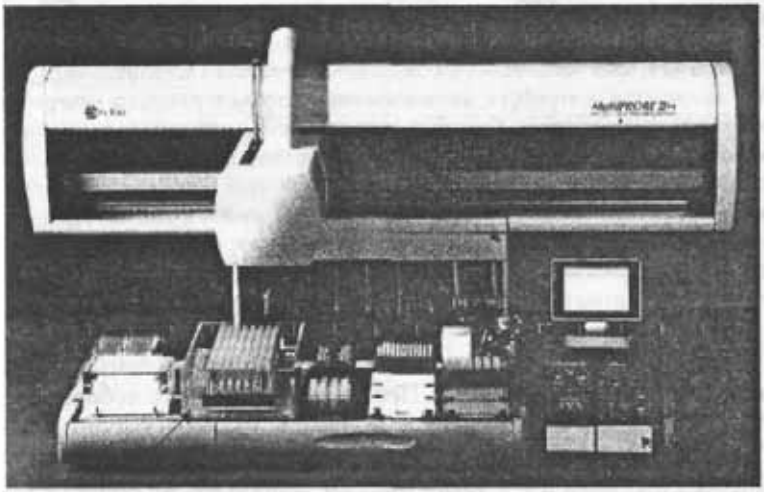


Рис. 19. Модульная роботизированная система для пробоподготовки MultiPROBE 2 («Packard»).

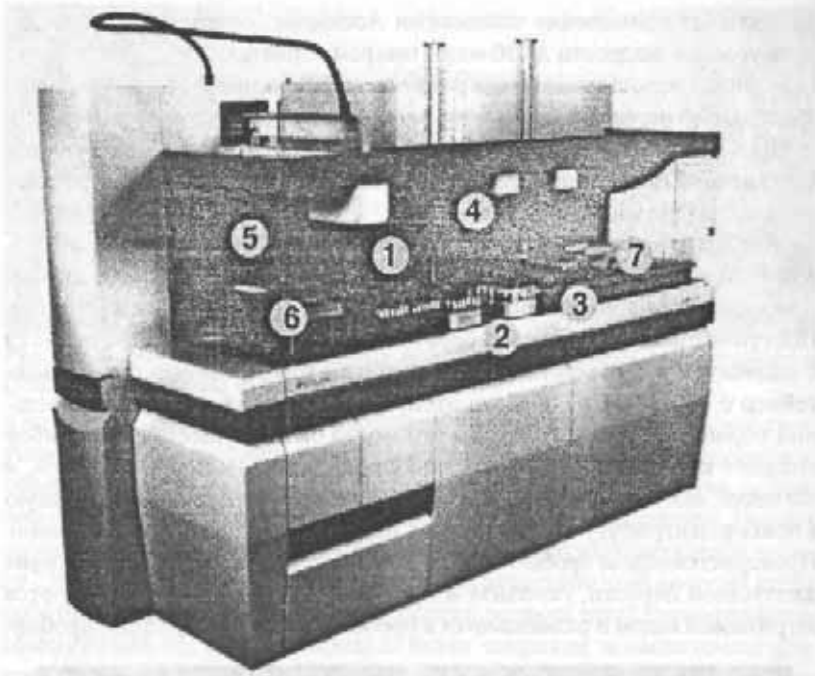


Рис. 20. Пробоподготовительный комплекс Genesis FE500 («TECAN», «Abbott Diagnostics»). 1. Блок наполнения пробирок для подготовки и идентификации проб. 2. Автоматическая центрифуга: автоматическая загрузка и разгрузка центрифуги пробирками, автоматическая балансировка ротора для оптимального центрифугирования. 3. Блок проверки проб : контроль объема пробы , проверка наличия желтушности, гемолиза, липемии. 4. Блок откупоривания пробирок (снятие крышек). 5. Блок вторичных пробирок: автоматическая подача вторичных пробирок для аликвот и нанесение штрихового кода на пробирки. 6. Блок пипетирования: быстрое пипетирование требуемых аликвот. 7. Блок сортировки и расставления пробирок по кассетам (возможность адаптации к различным типам кассет).

ки, в которые пипетируется необходимое количество обработанной сыворотки из первичных пробирок. Пробы сортируются, т.е. собираются в кассеты по видам исследований, готовые для переноса на автоанализаторы. Такого рода «front-end»- рабочая ячейка способна обработать 300 первичных пробирок в час. Более мощный прибор той же серии Genesis FE 1500 обрабатывает вдвое большее число пробирок в час. На рис. 21 а

и б представлены внешний вид и блок -схема устройства автоматизированной системы для отбора проб, их сортировки и маркирования вторичных пробирок VS II («Roche Diagnostics»). Фирма «Olympus» предлагает пробоподготовительные автоматические системы различной мощности OLA 1500, OLA 4000, OLA 6000, OLA 2000.

С учетом лабильности ряда аналитов под влиянием температуры, под воздействием ультрафиолетового облучения в приборах может быть обеспечено охлаждение образцов, размещение их в пробирках из затемненного материала и т.д.

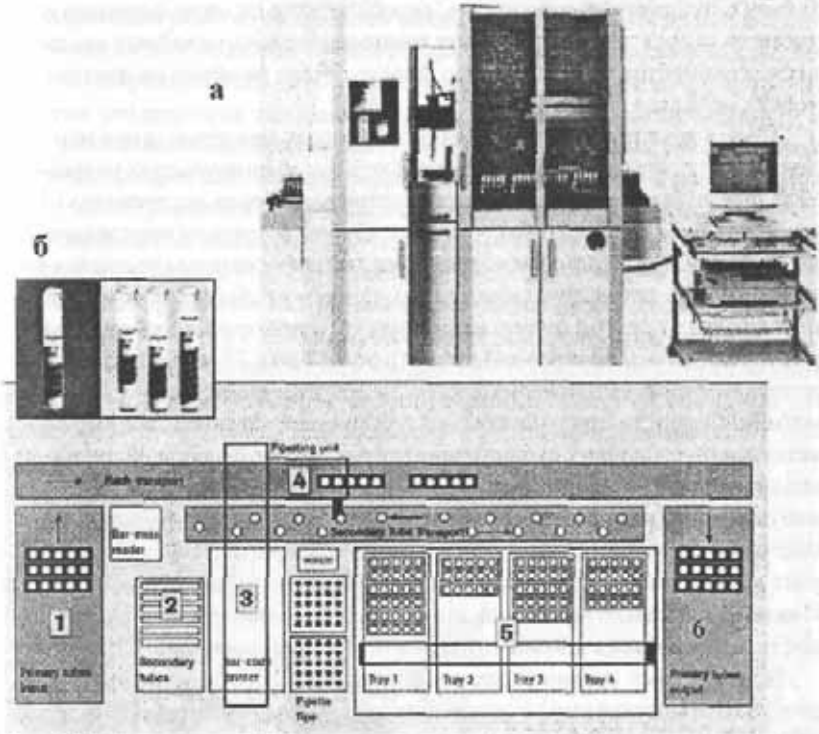


Рис. 21. Автоматизированная система для дозирования, сортировки и маркировки вторичных пробирок VS II («Roche Diagnostics»). а) внешний вид системы б) блок-схема системы: 1. Ввод первичных пробирок. 2. Размещение вторичных пробирок. 3. Нанесение штрих-кода на вторичные пробирки (термопринтер). 4. Дозирование проб. 5. Блок сортировки пробирок .6. Выход первичных пробирок.

В тех случаях, когда зона первичной обработки образцов в помещении лаборатории отдалена от анализаторов, перемещение рассортированных и распределенных по видам исследований проб биоматериалов может осуществляться не только вручную, но и как по стационарной конвейерной линии, так и с помощью специальных роботов (RoboCart).

В тех случаях, когда белки и другие интерферирующие вещества могут отрицательно повлиять на результаты анализов, в анализаторах могут быть предусмотрены устройства для диализа биоматериала через полупроницаемую мембрану или для колоночной хроматографии с использованием гель-фильтрации или ионообменников. В приборах, использующих средства «сухой химии», освобождение от интерферентов достигается за счет соответствующих компонентов многослойных аналитических элементов или с помощью фильтрующих мембран на диагностических полосках.

Точная дозирование порций образца, взятых для проведения определенного анализа (проб), достигается с помощью дозирующих устройств типа шприцов или автоматических пипеток в приборах дискретного типа, а в проточных анализаторах - за счет трубок со строго определенным внутренним диаметром, в которые биоматериал и реагенты подаются под действием перистальтического насоса, причем пробы отделяются в этом потоке одна от другой пузырьками воздуха. В проточных автоанализаторах трубки имеют внутренний диаметр от 0,13 до 2,79 мм, а насосы обеспечивают скорость движения жидкости по трубкам порядка 0,015 - 3,90 мл/мин. Скорость продвижения анализируемой жидкости должна соответствовать скорости осуществления реакции, составляющей сущность аналитического процесса. Пузырьки воздуха обеспечивают и уменьшение опасности взаимного загрязнения проб (переноса), очищая внутренность стенок трубки от остатков предыдущей пробы. Такую же роль играет добавление в поток жидкости поверхностно активного детергента. Понятно, насколько важна для достижения точного результата синхронность действий всех компонентов аналитической системы.

В дискретных анализаторах пипетирующие устройства должны быть не только отъюстированы в отношении дозируемых объемов пробы и реагентов, но и точно запрограммированы на промежутки времени в рабочем цикле прибора. Скорость дозирования проб и реагентов определяет производительность прибора. Дозирующие устройства могут быть с фиксированным и вариабельным объемом дозирования. Обычно в приборах, рассчитанных на один вид исследований, дозаторы имеют фиксирован-

ные объемы дозирования, тогда как в многопараметровых селективных анализаторах дозаторы должны быть способны перенастраиваться на различные объемы дозирования по вводимым командам или по заданным программам (рис. 22). Дозаторы как для проб, так и для реагентов, должны обладать правильностью и воспроизводимостью не хуже уровня 99%.

Перенос, т.е. взаимозагрязнение проб, не должен превышать 1%. Снижение переноса достигается за счет использования детергентов, улучшения процедуры промывания повторно используемых емкостей для проб, применения одноразовой посуды. Не менее важно обеспечение хорошего промывания дозаторов между циклами дозирования проб.

Хранение реагентов является важной проблемой, поскольку в автоматических анализаторах процесс должен быть непрерывно обеспечен соответствующими объемами реактивов. Для предотвращения их порчи многие анализаторы оснащены холодильными установками. Наряду с соображениями сохранности реактивов, не меньшее значение имеет и их рациональное использование. Хранимая партия реактивов должна соответствовать расчетной потребности в них, исходя из ожидаемого количества анализов. В наибольшей степени это относится к реактивам короткого срока сохранности. Естественно, что предпочтение оказывается системам, рассчитанным на минимальные объемы проб и, соответственно, потребляемых для их исследования реактивов. Если проследить за эволюцией методов, выполняемых на автоматических анализаторах за прошедшие четыре десятилетия истории автоматизации в клинической лаборатории, отчетливо видна тенденция к использованию все более эко-

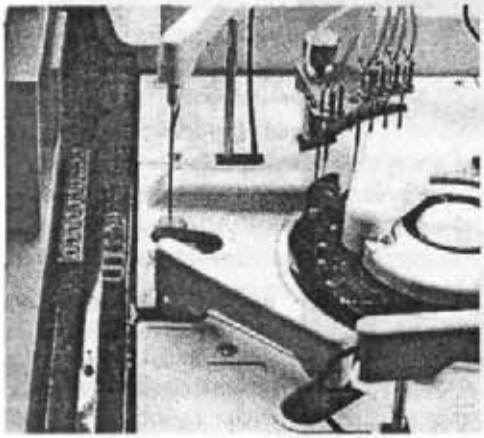


Рис. 22. Блок дозирования проб и реагентов в кюветы для фотометрии результатов в автоматическом анализаторе ILab 900 («Instrumentation Laboratory», Испания).

номных микрометодов, в частности за счет внедрения ферментативных методов исследования, вертикальных измерительных устройств, применения «сухой химии», ион-селективных электродов и т.д.

Применение средств « сухой химии», например, диагностических полосок Combur 10 в полностью автоматизированной системе для биохимического исследования мочи Supertron («Roche Diagnostics», Швейцария) (рис.23) или многослойных аналитических элементов в автоматических анализаторах Ektachem («Easteman Kodak») и Vitros («Johnson & Johnson») (рис. 24) существенно влияет на конструкцию автоматического анализатора, поскольку при этом отпадает необходимость в устройствах для дозирования реактивов, их охлаждения и т.п.

Фаза химической реакции в автоматических анализаторах конструктивно обеспечена по-разному. Необходимое для протекания реакции перемешивание материала пробы с реактивами в проточных анализаторах осуществляется при прохождении жидкости через спиралевидный участок трубок. При необходимости для реакции более высокой температуры этот участок размещается в водяной бане с требуемым уровнем температуры, а протяженность этого участка определяется скоростью протекания жидкости в сопоставлении с временем, необходимым для полного завершения реакции.

Рис. 23. Автоматический анализатор биохимических компонентов мочи Supertron (Roche Diagnostics, Швейцария).

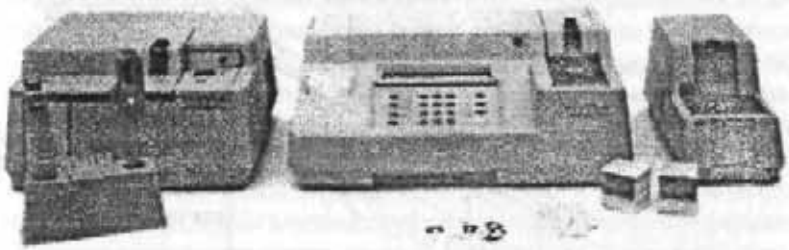


Рис. 24. Анализатор Vitros DT60 System («Johnson & Johnson. Clinical Diagnostics»), работающий с использованием миниатюрных многослойных аналитических элементов.

В дискретных анализаторах реакция может проходить в сосуде, куда была дозирована проба и введены растворы реактивов, либо в специальной реакционной камере. Перемешивание пробы с реактивами осуществляется различными способами: за счет быстрого впрыскивания реактивов *в сосуд с пробой, путем вибрации, использования механических мешалок*, магнитного перемешивания и т.п. Нагрев и термостатирование смеси пробы с реагентами осуществляется с помощью суховоздушной или водяной бани, специального нагревателя. Реакционные сосуды могут быть одноразовыми либо подлежащими промывке и повторному использованию. Оригинальное решение проблемы подачи реагентов было применено в автоматическом анализаторе *aca* фирмы « DuPont», где использовались готовые наборы реагентов в таблетированной форме для отдельных видов анализов, упакованные в специальные пластиковые контейнеры, выполняющие последовательно также роль реакционных сосудов, куда вводились растворитель для реактивов и проба биоматериала, и роль кювет при фотометрическом измерении результатов реакции (рис. 25).

В центрифужном анализаторе смешивание пробы с реактивами и перемещение смеси от центра ротора к измерительной ячейке, расположенной на периферии, происходит в радиальных углублениях ротора под действием центробежной силы при его вращении с переменной скоростью, а нагрев обеспечивается воздушной баней или электрическим нагревателем, размещенным непосредственно на роторе.

Измерение результатов анализов может осуществляться в том же сосуде, где проходила реакция или в специальной измерительной кювете, куда прореагировавшая смесь переносится током жидкости (проточный анализатор), при вращении (центрифужный анализатор) или отби-

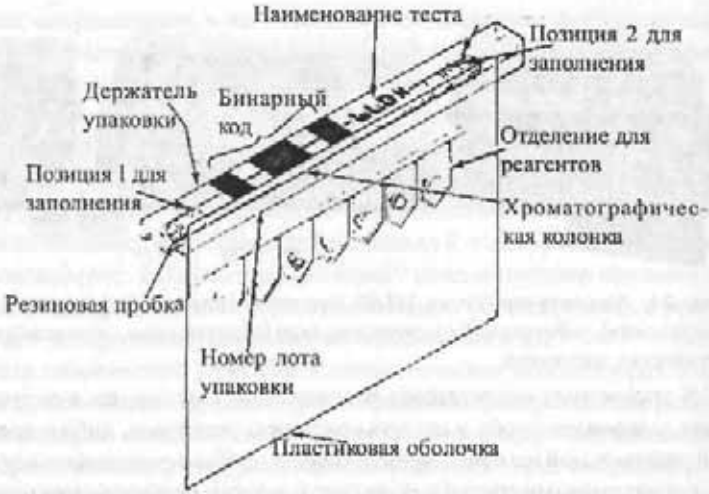


Рис. 25. Схематическое устройство упаковки таблетированных реагентов для дискретного биохимического автоматического анализатора *aca* фирмы «DuPont», США. Обозначения (верхний ряд, слева направо): 1. Резиновая пробка. 2. Позиция для наполнения 1 (колонка). 3. Держатель упаковки. 4. Бинарный код. 5. Мнемонически сокращенное наименование теста, реактивы для выполнения которого содержатся в упаковке. 6. Резиновая пробка. 7. Позиция для наполнения 2. Средний ряд , слева направо: 8. Номер лота упаковки реагентов. 9. Хроматографическая колонка. 10. Отделения для таблетированных реагентов, временные стенки, разрушаемые при механическом размельчении таблеток. 11. Прочная пластиковая оболочка, не разрушаемая при механическом размельчении таблеток реагентов.

рается специальным устройством . Чаще всего измеряется оптическая плотность прореагировавшей смеси, которая может сопоставляться с оптической плотностью холостой пробы, с калибратором. В других видах исследований может измеряться флуоресценция, хемилюминесценция, поляризация флуоресценции, рассеивание света, электрохимические характеристики и т.д. При фотометрической детекции в качестве источников света используются кварцевые, галогеновые, ксеноновые лампы, лазеры. Необходимый участок спектра выделяется интерференционными фильтрами, которые могут располагаться по периметру колеса и перемещаться в зону измерения в соответствии с командой или программой, когда соответствующий фильтр оказывается нужным для измерения концентрации определенного аналита. Свет, прошедший через пробу или эмиттированный ею воспринимается чаще всего фотоумножите-

лем или фотодиодом. Для исключения интерференции различных эндогенных и экзогенных компонентов может использоваться бихроматное (на двух длинах волн) и полихроматическое (на 3-16 длинах волн света) измерение светопоглощения продуктов реакции. При применении в анализаторе средств « сухой химии» для детекции и измерения результатов используется отражательный фотометр

При электрохимической детекции используются чаще всего ион-селективные электроды, в ряде случаев, сопряженные с закрепленным ферментом (определение электролитов, глюкозы, мочевины). Следует учитывать, что для получения надежного результата проба должна находиться в контакте с электродом примерно 20-30 сек. Этот интервал времени определяет скорость работы аналитического канала, оснащенного ион-селективными электродами. Реже в автоматических анализаторах используется кулонометрия (система с серебряным электродом для измерения хлоридов) и кондуктометрия (система с золотым электродом для измерения азота мочевины). Измерительное устройство может быть основано на применении биосенсора, как, например, в автоматическом анализаторе глюкозы в крови Glucose-analyser Baureihe Super G («RLT», Германия), где использован биосенсор, состоящий из содержащей фермент мембраны и платинового электрода (рис. 26 а и б). Анализатор может быть использован также для определения в крови содержания лактата. В автоматическом анализаторе Dimension применена интегрированная мультисенсорная технология MultiPLY, основанная на использовании компактного микрочипа для быстрого, в течение 48 сек. определения натрия, калия и хлоридов (рис. 27). Эта технология претендует на то, чтобы стать заменой ион-селективных электродов. Микрочип рассчитан на выполнение до 1200 исследований электролитов и работу в приборе в течение 2 дней. Фирма планирует оснащение прибора Dimension еще одним микрочипом, предназначенным для определения мочевины, глюкозы и креатинина.

Обработка сигнала, поступающего от детектора, происходит в микропроцессоре или компьютере, встроенном в анализатор или сопряженном с ним. При этом в программу закладывается не только преобразование сигнала в цифровую форму, но и сложный расчет результатов с учетом данных калибровки прибора, показаний холостой пробы и т.д. В современных аналитических приборах микропроцессоры выполняют обширный перечень функций, включая текущий контроль за функционированием отдельных блоков прибора, статистическую обработку результатов исследований, расчет средней арифметической, среднего квадратического от-

а

б

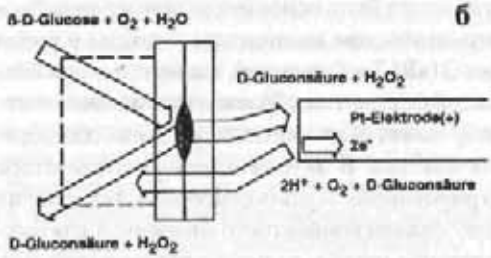


Рис. 26. Автоматический анализатор Glucose-analyser Baureihe Super G («RLT», Германия). а) Общий вид прибора (вместимость цепи для пробирок с пробами -150 позиций; диапазон измерения глюкозы: 0,6 - 50 ммоль/л или 11-900 мг/100 мл; диапазон измерения лактата 0,5-30 ммоль/л или 4,5-270 мг/100 мл; 2 калибровочных и 3 контрольных измерения в серии). б) Принцип измерения с помощью биосенсора.

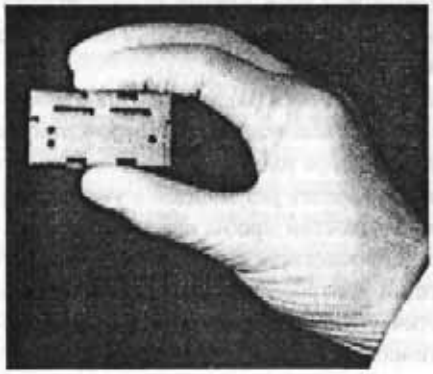


Рис. 27. Мультисенсорный чип (аналитический элемент) MultiPLY для определения натрия, калия и хлоридов, применяемый в автоматическом анализаторе Dimension XL фирмы «Dade».

клонения, коэффициента вариации, распечатку контрольных карт с одновременной интерпретацией результатов, накопление данных, полученных при исследовании проб пациентов, объединение результатов различных исследований, выполненных для одного пациента, и пр. (рис. 28).

Общий вид компановки деталей автоматического анализатора дискретного типа приведен на рис. 29 на примере ILab Systems («Instrumentation Laboratory»). В таблице 1 приведены технические характеристики некоторых автоматических анализаторов для биохимических исследований.

Начавшись с гематологии и клинической химии, процесс автоматизации далее охватил исследования системы свертывания крови, системы иммунной защиты, исследования мочи и ее осадка, микробиологические исследования, а в последнее время - и молекулярно-биологические методы. Таким образом, стала возможной автоматизация практически всех сторон деятельности клинических лабораторий. Особенности аналитических процедур, применяемых в этих видах исследований, а также инструментов, используемых при ручном выполнении анализов, определили своеобразие конструктивных решений автоматических аналитических систем, применяемых в гематологии, иммунологии, коагулологии, микробиологии, цитологии.

Механизация и автоматизация процесса микроскопии затрагивает различные компоненты устройства микроскопа. Так, в новейших системах микроскопов закладывается возможность различных способов возбуждения флюоресценции; формирования изображений в отраженном свете, совершенствование устройства конденсора, позволяющее легко менять способ контрастирования объектов в проходящем свете; автоматическое управление диафрагмой и фильтрами с помощью микропроцессора и сервомоторов. Таким образом, в распоряжение исследователя предоставляется роботизированный микроскоп.

При необходимости современные микроскопы оснащаются устройствами для фиксации изображений исследуемых объектов с помощью фотографии или видеозаписи. (см. раздел «Исследование клеток») Управление этим процессом через компьютер позволяет получать наилучшие варианты изображений. Дальнейшим шагом является подключение микроскопа в систему телемикроскопии для осуществления консультации у специалистов, находящихся в другом учреждении или в другом городе.

Полностью автоматизированные системы для микроскопии, наряду с автоматизацией самого процесса микроскопии, включают и компьютер-

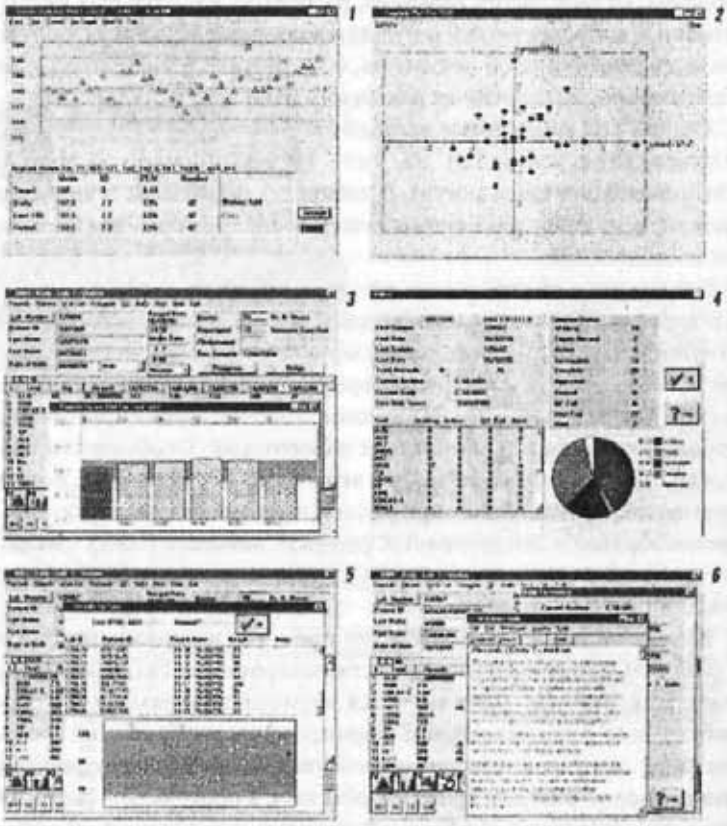


Рис. 28. Возможности автоматической обработки данных с помощью D-JMS (ILab 900). 1.Расчет среднего арифметического значения, среднего квадратичного отклонения, коэффициента вариации, выбор и применение правил Westgard, построение контрольного графика по Levey- Jennings. 2. Построение графика по Youden. 3. Данные истории болезни пациента, сравнение результатов в данный момент с предшествующими результатами по установленным критериям. 4. Быстрый обзор состояния системы, включающий результаты работы прибора, контроль качества по каждому тесту. 5. Обзор всех результатов в конце дневной работы, оценка тенденций в популяции. 6. Возможность консультации on-line с руководством для операторов ILIMS.

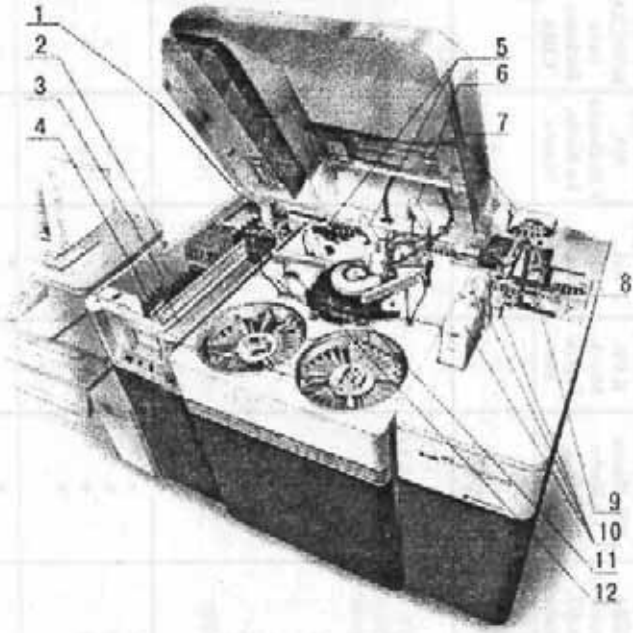


Рис. 29. Общий вид и компановка деталей устройства дискретного автоматического анализатора на примере анализатора ILab 900 («Instrumentation Laboratory», Испания). Обозначения деталей (сверху вниз)- слева: 1. Считыватель штрих-кода для положительной идентификации проб. 2. Гребенка для 30 кассет по 5 пробирок каждая. 3. Двойные направляющие для кассет после анализа (вместимость до 300 пробирок). 4. Охлаждаемые диски для хранения и подачи реагентов (60 видов реагентов на борту ILab 900; 120 - на борту ILabl800). Обозначения деталей (сверху вниз) - справа : 5. Стирреры. 6. Взятие проб для фотометрии (объем пробы от 2 до 30 мкл на тест). 7. Зона накопления кассет для повторных исследований. 8. Ввод проб для экстренных исследований. 9. Взятие проб для измерения ион-селективными электродами содержания натрия, калия и хлоридов методом непрямой потенциометрии. 10. Реагенты ион-селективных электродов. 11. Зона проведения реакции (объем реакционной смеси от 250 до 600 мкл, время реакции 8.4 мин, 43 отсчета, методы измерения результатов -по конечной точке, фиксированному времени и скорости реакции, стационарные кюветы из стекла Рутех, пробег луча 6 мм, температурный контроль, вращающийся фотометр для прямого измерения на одной, двух или трех длинах волн, диапазон измерений от 340 до 900 нм с помощью голографической решетки и светодиодов). 12. Диспенсеры реагентов (объем реагентов от 20 до 400 мкл на тест).

Таблица 1

Технические характеристики некоторых автоматических анализаторов для биохимических исследований.

Наименование анализатора, фирма – изготовитель, страна / Технические характеристики	Konelab 20i Labsystems ,Финляндия	Konelab 30i Labsystems ,Финляндия	Konelab 60i Labsystems ,Финляндия	COBAS INTEGRA, F.Hoffmann-La Roche AG, Швейцария	COBAS FARA F.Hoffmann La Roche AG, Швейцария	SELECTRA II, Merck, Германия	Dimension Rx1., DADE-Behring, США -	HITACHI 917, F.Hoffmann La Roche, Швейц.	SYNCHRON CX5 Delta Beckman США
Конфигурация									
-напольная	+	+	+	+			+	+	+
-настольная					+	+			
Принцип работы									
-дискретный	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-центрифужный					+				
-поточный									
-селективный	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-с жесткой программой (*серийный*)									
- выбор проб для анализа в произвольной последовательности - random access) .	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Принцип измерения									
-фотометрия	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-турбидимерия	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-нефелометрия					+				
-электрохимический для ISE:							+		
-прямая потенциометрия;	+	+	+	+	+	+		+	+
-непрямая потенциометрия				+	+	+		+	
-поляризация флуоресценции				+	+				
- флуоресценция					+				
Оптическая система:									
-фотометр	+	+	+			+	+		
-спектрофотометр				+	+			+	+
-источник света:									
-галогеновая лампа;	+	+	+	+	+	+	+	+	
-импульсная ксеноновая лампа									+
спектральный диапазон, нм	340-700	340-700	340-700	340-660	285-750	340-620	293-700	340-800	340-700
-спектральное деление:									
- интерференционные	+	+	+			+,8	+,10		
светофильтры, количество, шт.	11	11	11						
-монохроматор				+,12 фикс. длин волн	+	-0,1-3,0	0-2,0	+,12 фикс длин волн	+,10 фикс. длин волн
-диапазон измерения оптической плотности, ед. опт. плоти.	0-2,5	0-2,5	0-2,5	0-2,0	0- 3,0			0-3,3	0-1,5
- режимы измерения:									
- конечная точка;	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- кинетический;	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 точки, кинетика; (фиксированное время)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- фиксированная абсорция									
- двуволновые измерения	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- многоволновые измерения							+		

Наименование анализатора, фирма – изготовитель, страна/технические характеристики	Konelab 20i	Konelab 30i	Konelab 60i	COBAS INTEGRA, F.Hoffmann-La Roche AG, Швейцария	COBAS FARA F.Hoffmann La Roche AG, Швейц.	SELECTRA II, Merck, Германия	Dimension RxL, DADE-Behring, США	HITACHI 917, F.Hoffmann La Roche, Швейц.	SYNCHRON CX5 Delta Beckman США
	Labsystems Финляндия								
ISE:	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Na^+	+	+	+	+	+	+	+*	+	+
K^+	+	+	+	+	+	+	+*	+	+
Cl^-	+	+	+	+	+		+*	+	+
Li^-	+	+	+	+	+				+
Ca^{++}	+	+	+	+	+		+*		
pH	+	+	+						
CO_2									+
глюкоза,							+*		
мочевина							+*		
креатинин							+*		
Срочные анализы:									
-без прерывания серии;	+	+	+	+		+	+		+
-количество позиций для срочных анализов;	5	6	6	срочные анализы готовы через 2 мин		3			
-с прерыванием серии					+ 26 позиций			+,55-110	
Производительность исследований в час:									
-фотометрических;	200	300	600	600	240	133 (180)*	800-1000 ,(ок. 2 млн. ан / год)	800	
-фотометрических + ISE	380	480	780	800	400	222 (300)*		1200	600
Количество программируемых аналитов (методов)	>50	>50	>50	90	104	> 60	>60 +22 открытых канала	90	28
Количество программируемых профилей.					26				100

Аналиты									
-субстраты,	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-ферменты,	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-ионы (ISE)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-специфические белки;	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-лекарственный мониторинг;	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-наркотические и токсикологические препараты;	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-гормоны				+	+	+	+	+	(кач.)
-другие специальные исследования;	анализ воды, пищевых продуктов	анализ воды, пищевых продуктов	анализ воды, пищевых продуктов		аммиак, этанол, фруктозамин	лактат, бикарбонат	аммиак в моче, Mg^{++} опухолевые маркеры, маркеры повреждения сердечной мышцы	гликогемоглобин, фруктозамин, миоглобин и другие маркеры повреждения сердечной мышцы, показатели гемостаза и уриналиа	показатели гемостаза
-расчетные показатели	+	+	+	+	+ 26 расчетных показателей	+	+	+	+
Емкость пробоприемника	84	84	84	150	150	48	260	110	42
-количество мест для биожидкостей пациентов, не включая позиции для срочных проб									
-специальные позиции для:									

Наименование анализатора, фирма – изготовитель, страна/технические характеристики	Konelab 20i Labsystems ,Финляндия	Konelab 30i Labsystems ,Финляндия	Konelab 60i Labsystems ,Финляндия	COBAS INTEGRA, F.Hoffmann-La Roche AG, Швейцария	COBAS FARA F.Hoffmann La Roche AG, Швейцария	SELECTRA II, Merck, Германия	Dimension RxL, DADE-Behring, США -	HITACHI 917, F.Hoffmann La Roche, Швейцария	SYNCHRON CX5 Delta Beckman США
-срочных анализов -калибровочных проб -контрольных проб -специальные пробы	5	6	6	не ограничено 24 позиции для калибровочных и контрольныхпроб	до26 10 позиций для калибровочных и контрольных проб*	14 калибровочных и котрольных проб педиатрических проб		55-110 57 позиций для калибровочных и контрольных проб	7 произвольное программирование
Биожидкости: -сыворотка, -плазма, -моча, -спинномозговая жидкость -гемолизат	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
Идентификация биожидкостей	штрих-код	штрих-код	штрих-код	штрих-код; номер, код, имя пациента могут быть введены с клавиатуры оператором		штрих-код как опция	штрих-код	штрих –код, вручную с клавиатуры, извне анализатора через систему DP	штрих код 4 типа
Пробы: объем, мкл -типичный, мкл -для ISE, мкл -автоматическое разведение проб	1-120 2-15 50 +	1-120 2-15 50 +	1-120 +	2-10 20-97 +	2-95 +	2-30 +	2-60 10-12 не более 50 +	2-35 +	3-30 62 +
-автоматическая концентрация проб	+	+		+		+	+ +	+	
-"перенос" при пипетировании проб	< 1%	<1%							
Реактивы: -открытая система -закрытая система; -объемы реактивов, мкл, -количество реактивов в модуле для реактивов -охлаждение реактивов при хранении в анализаторе -сигнализация об истощении реактивов -количество реактивов на 1 анализ	+ 2-250 35 + + 1-4	+ 2-250 45 + + 1-4	+ 2-250 45 + + 1-4	+ 120-240 72* + + до 3	+ 2-370 до 90 + + до 3	+ 10- 400 33 + + до 2	+** 180 до 88 + +	+ 20-270 90 + + до 4	+ 200-330 24 + + до3
Конечный объем реакционной смеси, мкл	100-250	100-250	100-250	120-250	до 400	типичный ок.250		180-380	250
Кюветы	на 12 ячеек для проведения реак-ций и измерений	на 12 ячеек для проведения реакций и измерений	на 12 ячеек для проведения реак-ций и измерений	миникюветы единичные в роторе	ротор на 28 секторов	ротор на 48 кювет	автоматическое производство кювет внутри анализатора из пленки Surlyn	в карусели кюветы многоразового пользования после промывки в автоанализаторе	

Наименование анализатора, фирма – изготовитель, страна/технические характеристики	Konelab 20i Labsystems ,Финляндия	Konelab 30i Labsystems ,Финляндия	Konelab 60i Labsystems ,Финляндия	COBAS INTEGRA, F.Hoffmann-La Roche AG, Швейцария	COBAS FARA F.Hoffmann La Roche AG, Швейцария	SELECTRA II, Merck, Германия	Dimension RxL, DADE-Behring, США -	HITACHI 917, F.Hoffmann La Roche, Швейц.	SYNCHRON CX5 Delta Beckman США
-количество кювет при загрузке в анализатор	50 (600 исследований - 3 ч непрерывной работы)	50 (600 исследований -2 ч непрерывной работы)	175 (2100 исследований-4 ч непрерывной работы)	ротор на 99 кювет максимально, запас в анализаторе – 3000 кювет с возможностью дозарузки во время работы	максимально 1 ротор , с последующей сменой его вручную	48 кювет	12 000 кювет при каждом включении автоанализатора	160	80 реакционных и одновременно измерительных
Калибровка:									
- средний интервал,	8	8	8	4-8 недель	в зависимости от метода	в зависимости от метода	1 раз в 3 месяца	в завис.от метода**	до 90 дней
-способ:									
- по 1 калибровочному раствору,	+	+	+	+	+		+	+,C.f.a.s.	+
- по калибровочной кривой;	+	+	+	+	+	+	+	мультикал. +(до 6 станд.)	+
- по фактору	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-автоматическое разведение основного калибровочного раствора;	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-автоматическая коррекция смещения калибровки	+	+	+	+		+		+	+
-Методы расчета:						+			
-линейная зависимость (по фактору, по калибратору)	+	+	+	+	+		+	+	+

-нелинейная калибровка	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- от точки к точке,					+				+
- кубистический сплайн					+				+
- logit-log -4					+				
- logit-log - 5					+				
Термостатирование	37°C ±0,2C°	37 °C ±0,2°C	37° C ±0,2°C	37°±0,1°C	по выбору от 20 °C до 42°C	37 °C	37°C	37°C ±2°C	30°C ±0,1°C, 37 °C± 0,1°C
Возможность подключения линии для транспортировки проб	+	+	+			+	имеется модуль TLA (Total Lboratory Automation)	+	+
Система управления результатами									
-долговременное хранение данных пациентов, калибровок, контроля качества;	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- автоматический контроль качества:	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- в режиме реального времени;	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- построение контрольных карт Levy – Jennings	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- правила Büttner,	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- множественные правила Westgard;	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- составление сводного бланка результатов для пациента;	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Наименование анализатора, фирма – изготовитель, страна/технические характеристики	Konelab 20 i	30i	60i Labsystems Финляндия	COBAS INTEGRA, F.Hoffmann-La Roche AG, Швейцария	COBAS FARA F.Hoffmann La Roche AG, Швейцария	SELECTRA II. Merck, Германия	Dimension RxL, DADE-Behring, США	HITACHI 917, F.Hoffmann La Roche, Швейцария	SYNCHRON CX5 Delta Beckman США
- возможность введения вручную в бланк результатов, полученных вне анализатора ;	+	+	+	+	+	+	+***	+	+
- распечатка результатов на внешнем принтере	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-сообщение о патологическом результате	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-отчет о результатах	+	+	+	+	+	+	+		
-интерфейс к ЛИС	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Потребление дист. воды,л/ч	< 1	<1,5	<2,5	5-7	ок.0,4	ок. 0,5	3,2	40	6,5
Масса,кг	150	200	250	420	165,1	90	365	ок.350	367
Примечание	Автоматический контроль чистоты 12 ячеечных реакционных и измерительных кювет одноразового пользования			* Реактивы для биохимических и иммунохимических исследований расположены в 68 кассетах на борту анализатора, до3флаконов в кассете , автоматическая идентификация кассет по штрих-коду	* при необходимости может быть использовано более 10	*- при использовании 1 реактива; промывка кювет внутри анализатора	*- в модуле для срочных анализов CHEM-7 STAT уникальная технология производства реакционных и фотометрических кювет внутри ана лизатора, которые после окончания реакции и измерения закленваются и сбрасываются в контейнер с отходами; модульная структура анализатора (модули: TLA- для полной лабораторной автоматизации; IMS-удвоение количества Flex картриджей реактивов, CHEM-7 STAT –для срочных анализов. **- 22 свободно программируемых тестов *** при подключении к LIS	-промывка кювет внутри анализатора	промывка кювет внутри анализатора; наличие режима "cut off" при исследованиях наркотических веществ

Наименование анализатора, фирма-изготовитель, страна Технические характеристики	VITROS 250 Jonson &Jonson США (автоанализаторы, "сухая химия" на пленках-слайдах)	VITROS 950	ERBA SMART LAB, TRASASIA Nittec Co., Япония	ALCYON™ ABBOTT LABORATORIES, США	Vitalab Eclipse Plus, Merk, Германия	SD 2000 Sigma Diagnostic, США	Cobas Mira, F.Hoffmann La Roche, Швейцария	Hitachi902 F.Hoffmann La Roche, Швейцария	AutoHumalyzer900S HUMAN, Германия
Конфигурация									
- напольная	+	+						+	
- настольная			+	+	+	+	+		+
Принцип работы:									
-дискретный,	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-центрифужный,									
-поточный,									
-селективный,	+	+	+	+		+	+*	+	+(по пациентам)
-с жесткой программой(серийный),					+				+(по тестам)
-выбор проб для анализа в произвольной последовательности (random access).	+	+	+	+	сериями	+		+	
Принцип измерения									
-фотометрия	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-турбидиметрия			+	+	+	+	+	+	+
-нефелометрия									
-электрохимический для ISE:	+	+		+		+		+	
-прямая потенциометрия						+		+	
-непрямая потенциометрия									
-поляризация флуоресценции									
-флуоресценция.									

Оптическая система:									
-фотометр			+	+	+	+	+	+	+
-спектрофотометр	+*	+*							
-источник света:									
-галогеновая лампа,	+	+	+		+			+	+
-импульсная ксеноновая лампа.							+		
-спектральный диапазон, нм	340-680	340-680	340-670	340-600	330-900	340-620	340-750	340-800	340-620
-спектральное деление:									
-интерференционные	+	+	+	+	+	+	+	+	+
светофильтры, количество, шт.	10	10	8	6	8	8	5(+2доп.)	12	8
-монохроматор									
-диапазон измерения оптической плотности, ед. опт. плотн.,			0-2,5	0-2,7	0-2,3		0-2,4		0-3,0
-режимы измерения:									
-конечная точка;	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-кинетический;	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-2 точки, кинетика (фиксированное время)	+	+	+	+	+	+			+
-фиксированная абсорбция					+				
-двуволновые измерения,	+	+	+		+	+	+	+	+
-многоволновые измерения.				+ одновр. для всех проб					

Наименование анализатора, фирма-изготовитель, страна Технические характеристики	VITROS 250	VITROS 950	ERBA SMART LAB, TRASASIA Nittec Co., Япония	ALCYON^{M} ABBOTT LABORATORIES, США	Vitalab Eclipse Plus, Merk, Германия	SD 2000 Sigma Diagnostic, США	Cobas Mira, F.Hoffmann La Roche, Швейцария	Hitachi902 F.Hoffmann La Roche, Швейцария	AutoHumalyzer900S HUMAN, Германия
	Janson &Janson США (автоанализаторы, "сухая химия на пленках-слайдах")								
ISE:	+	+		+			+	+	
Na^+	+	+		+			+	+	
K^+	+	+		+			+	+	
Cl^-	+	+		+			+	+	
Li^+									
Ca^{++}							+		
pH									
CO_2	+	+							
глюкоза, мочевина, креатинин									
Срочные анализы:	+	+	+	+		+	+	+	+
-без прерывания серии;				+			+		
-количество позиций для срочных анализов;									
-с прерыванием серии	+	+	+			+			+
Производительность, исследований в час:									
-фотометрических;	250	950	120(конечная точка)	300	100-200	ок.75-100	144	200	до180
-фотометрических + ISE				450			216	300	
Количество программируемых аналитов (методов).	41	43	48	99	40		до 104	до 38	>30
Количество программируемых профилей	15	не менее 15	6 (по 16 аналитов в каждом)	9 (по 45 аналитов в каждом)			26	11	не ограничено
Аналиты:									
-субстраты,	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-ферменты,	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-ионы (ISE),	+	+	+(фотометр.)	+	+(фот.)	+(фотометр.)	+	+	+(фотометр)
-специфические белки;	+**	+**	+	+	+	+	+	+	+
-лекарственный мониторинг;	+	+	+	+		+	+		
-наркотические и токсикологические препараты;	+	+		+			+	+	
-гормоны.			+						
-другие специальные исследования;	CO_2, лактат, литий белок, креатинин, кальций, мочевина, мочевая кислота, глюкоза в моче, белок в спинно-мозговой жидкости	CO_2 лактат, литий, белок, креатинин, кальций, мочевина, мочевая кислота, глюкоза, в моче, белок в спинно-мозговой жидкости		+ глюкоза и белок в спинно-мозговой жидкости, молочная кислота, продукты деградации фибрина, фибриноген, гликированный гемоглобин, фруктозамин			+ фруктозамин, аммиак, фолат	+	
-расчетные показатели									

Наименование анализатора, фирма-изготовитель, страна Технические характеристики	VITROS 250 Jonson &Jonson США (автоанализаторы, "сухая химия" на пленках-слайдах)	VITROS 950	ERBA SMART LAB, TRASASIA Nittec Co., Япония	ALCYON[IM] ABBOTT LABORATO-RIES, США	Vitalab Eclipse Plus, Merk, Германия	SD 2000 Sigma Diagnostic, США	Cobas Mira, F.Hoffmann La Roche, Швейцария	Hi-tachi902 F.Hoffmann La Roche, Швейцария	AutoHumalyzer900S HUMAN, Германия
Емкость пробоприемника: -количество мест для биожидкостей пациентов, не включая позиции для срочных проб;	40	40	45	39	32	60	90	35	60
-специальные позиции для:							?		
- срочных анализов,				2				+	
- калибровочных проб, контрольных проб			позиция программируется произвольно	3	1 1	позиции программируются произвольно	8 для калибровочных и контрольных проб		позиции программируются произвольно
Биожидкости:									
-сыворотка,	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-плазма,	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-моча,	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-спинномозговая жидкость	+	+	+	+	+		+	+	
-гемолизат									

Идентификация биожидкостей	штрих-код	штрих-код	номер, код, имя пациента программируются с клавиатуры оператором	штрих-код	номер, код, имя пациента программируются с клавиатуры опера-тором	номер, код, имя пациента программируются с клавиатуры оператором	штрих-код, номер, код, имя пациента могут программироваться с клавиатуры оператором	штрих-код	номер, код, имя пациента программируются оператором с клавиатуры
Пробы: объем, мкл			от3				2-95	5-50	от 3
-типичны, мкл	10	10		2-30	5-50	5-20	2-20		
-для ISE,мкл,	10	10							
-автоматическое разведение проб;	+	+		+			+	+	
-автоматическая концентрация проб;							+	+	
-"перенос" при пипетировании проб.	отсутствует ***	отсутствует ***	практически отсутствует						
Реактивы:									
-открытая система,			+	+	+	+	+	+	+
-закрытая система,	+****	+****							
-объемы реактивов, мкл,			500-1000	150-388	500-1000		ок.180		250-500
-количество реактивов в модуле для реактивов,			16	+ для 15 реактивов		18	до30	36 +	+ для 9 реактивов

Наименование анализатора, фирма-изготовитель, страна Технические характеристики	VITROS 250 Johnson & Johnson США (автоанализаторы, "сухая химия" на пленках-слайдах)	VITROS 950 Johnson & Johnson США (автоанализаторы, "сухая химия" на пленках-слайдах)	ERBA SMART LAB, TRASASIA Nittec Co., Япония	ALCYON[01] ABBOTT LABORATO-RIES, США	Vitalab Eclipse Plus, Merk, Германия	SD 2000 Sigma Diagnostic, США	Cobas Mira, F.Hoffmann La Roche, Швейцария	Hitachi902 F.Hoffmann La Roche, Швейцария	AutoHumalyzer900S HUMAN, Германия
-охлаждение реактивов при хранении в анализаторе,									
-сигнализация об истощении реактивов	+	+	+	+		+	+	+	+
-количество реактивов на 1 анализ	1 слайд	1слайд	до 2	до2	1		до 2	до 2	
Конечный объем реакционной смеси, мкл			500-1000	150	500	400	150-600	200-250	250-500
Кюветы количество кювет при загрузке в анализатор	отсутствуют	отсутствуют	96 кювет для реакций, смена и мытье вручную 1измерительная проточная,18мкл	228 (автоматическая смена кювет)	36 реакционных, кювет, 1 измерительная проточная, 32 мкл	120 реакционных кювет, 1измерительная, 70 мкл	72 (6 сегментов в роторе по 12 кювет)	48, многоразовые, реакционные и измерительные, мытье автоматическое в анализаторе	120 реакцион-ных кювет(смена и мытье вручную),1 измерительная проточная
Калибровка: -средний интервал, ч	1 раз в 6 месяцев	1 раз в 6 месяцев	в зависимости от метода	в зависимости от метода	в зависимости от метода	в зависимости от метода	в зависимости от метода**		зависит от метода

-способ: -по 1 калибровочному раствору	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-по калибровочной кривой,			+(6точек)	+	+(10 точек)	+(9 точек)	+	+	+
-по фактору,	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-автоматическое разведение основного калибровочного раствора				+		+	+		
-автоматическая коррекция смещения калибровки;							+***		
Методы расчета: -линейная зависимость (по фактору, по калибратору),			+	+	+	+	+	+	+
-нелинейная калибровка: -от точки к точке,	+(со сплайновым алгоритмом линеаризации)	+(со сплайновым алгоритмом линеаризации)	+	+		+	+	+	+
-кубистический сплайн,				+		+	+		
-logit-log по 4 параметрам;						+	+		
-logit –log по 5 параметрам						+	+		
-logistic									

Наименование анализатора, фирма-изготовитель, страна Технические характеристики	VITROS 250 Jonson &Jonson США (автоанализаторы, "сухая химия" на пленках-слайдах)	VITROS 950	ERBA SMART LAB, TRASASI A Nittec Co., Япония	ALCYON™ ABBOTT LABORATO-RIES, США	Vitalab Eclipse Plus, Merk, Германия	SD 2000 Sigma Diagnostic, США	Cobas Mira, F.Hoffmann La Roche, Швейцария	Hitachi902 F.Hoffman La Roche, Швейцария	Auto Hima-lyzer900S HUMAN, Германия
Термостатирование	37°C ±0,1°C	37°C ±0,1°C	25°C,30°C, 37°C	37°C±0,1°C	25°C,30°C, 37°C	25°C±0,2°C 30°C±0,2°C 37°C±0,2°C	37°C-	37 °C	25C,30°C, 37C°
Возможность подключения линии для транспортировки проб	+	+						+	
Система управления результатами: -долговременное хранение данных пациентов, калибровок, контроля качества;	5000 рез-тов	+		+	+(контр. кач-ва)	+	+4000рез-тов, 150 пациентов	+	+
-автоматический контроль качества:	+	+		+	+	+	+		+
-в режиме реального времени;	+	+		+	+	+	+		+
-построение контрольных карт Levy-Jennings	+	+		+	+	+	+		+
-правила Buttner	+	+		+		+	+		
-множественные правила Westgard;	+	+		+			+		
-составление сводного бланка	+	+	+	+		+	+	+	+

результатов для пациента;	+	+	+	+		+?			
-возможность введения в бланк результатов, полученных вне анализатора;	+	+		+					
-распечатка результатов на внешнем принтере;	+	+					+		
-сообщение о патологическом результате;	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-отчет о результатах;	+	+							
-интерфейс к ЛИС	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Потребление дист. воды, л/ч	нет необходимости		0,5/ 24ч	4	не более 0,5/24ч	не более 0,5 /24 ч	ок.5 / 24ч	20	2,0/24ч
Масса, кг	272	681	38	95	10		100		52
Примечание	*отражательная спектрофотометрия. **СРБ. ***пипетирование каждой биожидкости отдельным наконечником. ****"сухая химия "на многослойных слайдах -4 инкубатора на анализаторе VITROS 950 - хранение слайдов в автоанализаторе при постоянной температуре 25°C и влажности; - сенсорный экран дисплея			сенсорный экран дисплея. *до1,2 млн результатов			могут быть использованы первичные пробирки Roche закрытые крышками. *селективность по тестам или по пациентам ** до 1 месяца ***коррекция калибровочной кривой по одной точке		

Продолжение таблицы 1

Наименование анализатора, фирма-изготовитель, страна/характеристики	ChemWell, Awareness Technology, США
Конфигурация -напольная; -настольная	 +
Принцип работы: -дискретный; -центрифужный; -поточный; -селективный; -с жесткой программой; (серийный); -выбор проб для анализа в произвольной последовательности (random access)	 + + +
Принцип измерения: -фотометрия; -турбидиметрия; -нефелометрия; -электрохимический для ISE: -прямая потенциометрия; -непрямая потенциометрия; -поляризация флуоресценции; -флуоресценция.	 + +
Оптическая система: -фотометр, -спектрофотометр; -источник света: -галогеновая лампа: -импульсная ксеноновая лампа; -спектральный диапазон, нм.; -спектральное деление: -интерференционные светофильтры, количество, шт.: -монохроматор; -диапазон измерения оптической плотности, ед.опт. плотн. -режимы измерения: -конечная точка, -кинетический; -2 точки, кинетика;	 + + 340-700 0-2,5 + + +
(фиксированное время); -фиксированная абсорбция, -двуволновые измерения; -многоволновые измерения	 +
Аналиты: -субстраты, -ферменты; -ионы (ISE)	 + +

-специфические белки; -лекарственный мониторинг; -наркотические и токсикологические препараты; -гормоны; -другие специальные исследования; -расчетные показатели.	+ + + (кач.) + +
Срочные анализы: -без прерывания серии; -количество позиций для срочных анализов; - с прерыванием серии.	
Производительность, исследований в час: -фотометрических; -фотометрических+ISE	240
Количество программируемых аналитов (методов). Количество программируемых профилей.	100
Емкость пробоприемника -количество мест для биожидкостей пациентов, не включая позиции для срочных проб; -специальные позиции для: -срочных анализов, -калибровочных проб, -контрольных проб -специальные пробы	96 произвольное программирование
Биожидкости: -сыворотка, -плазма, -моча, -спинномозговая жидкость, -гемолизат	 + + + +
Идентификация биожидкостей	
Пробы: объем, мкл -типичный, мкл -для ISE, мкл, -автомитическое разведение проб; -автоматическая концентрация проб; -"перенос" при пипетировании проб	2-30 2-5 + <1%
Реактивы: -открытая система, -закрытая система; -объемы реактивов, мкл -количество реактивов в модуле для реактивов; -охлаждение реактивов при хранении в анализаторе; -сигнализация об истощении реактивов; -количество реактивов на 1 анализ	 + 150-250 40 + до4
Конечный объем реакционной смеси, мкл	250

Кюветы -количество кювет при загрузке в анализатор	96-луночный плоскодонный планшет или стрипы 96
Калибровка: -средний интервал, ч. -способ: -по 1 калибровочному раствору; -по калибровочной кривой; -по фактору; -автоматическое разведение основного калибровочного раствора; -автоматическая коррекция смещения калибровки. -Методы расчета: -*линейная зависимость (по фактору, по калибратору)*; -нелинейная калибровка: -от точки к точке, -кубистический сплайн, -logit-log-4; -logit-log-5.	 в зависимости от метода + + + + + + + + + + +
Термостатирование	регулируемое, температура от комнатной до 37°C±0,1°C
Возможность подключения линии для транспортировки *проб*	
Система управления результатами: -долговременное хранение данных пациентов, калибровок, контроля качества; -автоматический контроль качества: -в режиме реального времени; -построение контрольных карт Levy-Jennings -правила Büttner, -множественные правила Westgard; -*составление сводного бланка результатов пациента*; -возможностность введения вручную в бланк результатов, полученных вне анализатора; -распечатка результатов на внешнем принтере; -сообщение о патологическом результате; -отчет о результатах; -интерфейс к ЛИС	 + + + + + + + + + + + + +
Потребление дист. воды,л/ч	<1
Масса, кг	70
Примечание	Возможно выполнение ИФА в планшетах и стрипах, встроенное промывающее устройство.

ный анализ, т.е. распознавание и классифицирование изображений. Такая система состоит из автоматизированного микроскопа, куда ручным способом вносят фиксированные и окрашенные мазки биоматериала. Микроскоп сканирует препарат, фиксирует изображения клеток, «просеивает» изображения с помощью высоко-сложной аналитической системы, основанной на принципе «нервной сети» (neural network). При этом учитываются различные характеристики клеток, включая цвет, размер, структуру, плотность, отношение ядро/цитоплазма, что позволяет классифицировать наблюдаемые клетки. На основе заложенной в базу данных компьютера библиотеки изображений клеток объекты, наблюдаемые в препарате, классифицируются и составляется отчет о проведенном анализе в виде заполненного бланка. Информация также может быть передана в лабораторную информационную систему. По команде оператора на экране монитора могут быть представлены изображения тех или иных полей препарата, отдельных клеток или их групп (популяций специфических клеточных элементов), подозрительных или аномальных клеток и т.д. (см. раздел «Исследование клеток»). Использование системы ускоряет анализ мазков, увеличивает пропускную способность лаборатории, объективизирует процесс и результат анализа, способствует стандартизации интерпретации микроскопических исследований и т. д.

Другой вариант автоматизации дифференциального подсчета лейкоцитов с помощью микроскопии, но без использования мазков крови, состоит в следующем. Прибор загружается 30 образцами цельной крови с ЭДТУК или КЦД. С помощью автосемплера каждый образец крови перемешивается, идентифицируется с помощью штрих-кода, из него отбирается проба объемом 350 мкл. В результате добавления осаждающего реагента происходит быстрое осаждение до 80 % эритроцитов. Образовавшаяся обогащенная лейкоцитами плазма отсасывается, в нее добавляется специальный химический краситель для дифференциальной окраски всех форм лейкоцитов, при этом оставшиеся эритроциты полностью лизируются. Добавление третьего реагента восстанавливает тонус клеток перед их продвижением через измерительную камеру *проточного микроскопа*. В камере клетки освещаются лампой высокоскоростного стробоскопа и их изображения фиксируются цветной видеокамерой, передающей информацию в компьютер прибора. Второй модуль аналитической системы представляет собой компьютеризированную видеоустановку, программное обеспечение которой, обладающее свойствами « нервной сети», классифицирует клетки на основе данных об их размере, характере и плотности окрашива-

ния. На экране монитора результат анализа представлен изображениями всех форм лейкоцитов с данными об их пропорциональном представительстве в пробе. После визуального подтверждения лабораторным специалистом правильности классификации клеток результат передается в лабораторную информационную систему.

Более широко используемый подход к решению проблем дифференциации и подсчета различных видов клеток крови состоит в применении **проточных автоматических гематологических цитометров.** Основной принцип детекции в этих приборах - кондуктометрический. Клетки крови проходят через микроотверстие капиллярной трубки диаметром порядка 100 мкм, по обе стороны которой расположены электроды сети постоянного электрического тока. Появление клетки в отверстии повышает сопротивление в электрической цепи, возникающий при этом импульс регистрируется прибором, число импульсов подсчитывается. Кроме того, амплитуда импульса отражает объем клетки, что дает возможность построить гистограмму распределения клеток по их объему и позволяет получить информацию о разновидностях клеток.

Сопоставление нескольких параметров эритроцитов позволяет осуществить автоматический расчет некоторых индексов, ставших стандартными показателями состояния красного ростка крови: среднего объема эритроцита, среднего содержания гемоглобина в эритроците, средней концентрации гемоглобина в эритроците.

Сочетание кондуктометрического принципа с применением радиочастотного анализа, рассеивания света лазера, дифференцирующих лизатов, специфического окрашивания клеток позволило расширить использование автоматических анализаторов для анализа различных клеточных элементов крови. Так, например, подсчет базофилов и эозинофилов осуществляется в анализаторе, располагающем соответствующими детекторными каналами с применением специфических лизатов(см. раздел «Исследование клетки»).

Несколько отличается от описанного выше подход к определению гематологических показателей в новом автоматическом анализаторе ADVIA 120(«Bayer», США), основанном на технологии Unifluidics. В этом приборе весь процесс исследования различных компонентов крови происходит в моноблоке из акрила, что позволило уменьшить число деталей с 2500 до менее 800. В качестве источника света используются лазерные диоды. С максимальной скоростью 120 исследований в час (с ретикулоцитами - 74 в час)прибор выдает информацию о числе эритроцитов, их

субпопуляциях и эритроцитарных индексах; о числе лейкоцитов и полной лейкоцитарной формуле; числе тромбоцитов, тромбоцитарной формуле и тромбоцитарных индексах; гемоглобине, гематокрите, ретикулоцитах и ретикулоцитарной формуле; классах патологических клеток. Объем пробы 155 мкл крови (рис. 30).

Таким образом, в современных больших гематологических анализаторах, сочетающих различные принципы исследований и оценки клеток крови, заложены возможности определения 18 - 24 и более показателей, характеризующих различные аспекты состояния всех групп клеток крови.(таб. 2).

Автоматизация анализа осадка мочи предлагается в различных конструктивных решениях. Одно из них основано на совмещении процесса приготовления пробы - центрифугирования - с процессом самого микроскопического анализа осадка в оригинальной центрифуге с 6 центрифужными пробирками, имеющими в своих стенках зоны, позволяющие осуществлять микроскопию осадка без переноса пробы. Центрифу-

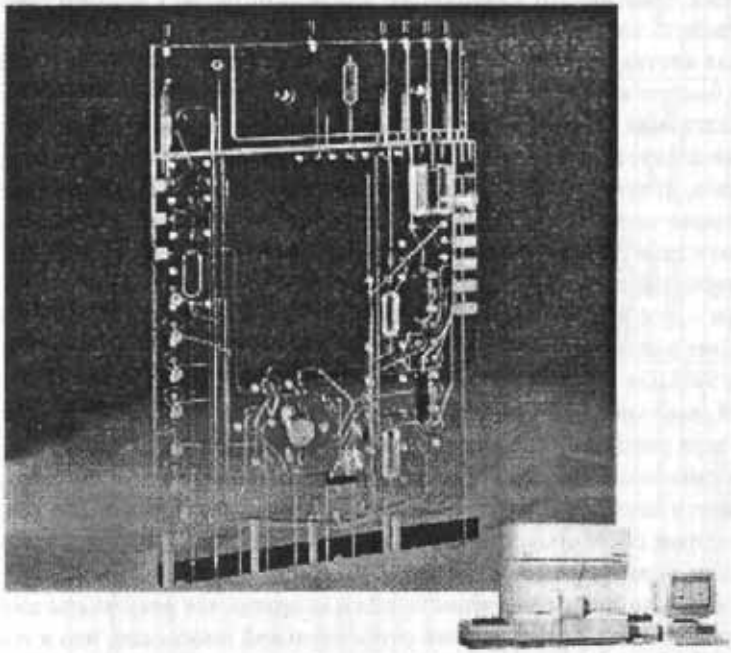


Рис. 30. Автоматический гематологический анализатор ADVIA 120 («Байер», Германия, США), основанный на технологии Unifluidics.

га управляется микропроцессором, что обеспечивает полную воспроизводимость условий пробоподготовки, необходимую степень концентрации осадка и распределение его по зоне микросколирования.

Другой подход к автоматизации анализа корпускулярного состава мочи основан на проточном принципе анализа. Прибор UF-100 является проточным цитометром (рис. 31 а). При прохождении через апертуру анализатора в потоке мочи корпускулярных элементов парные электроды отмечают изменение проводимости и регистрируется импедансный сигнал, что позволяет осуществлять подсчет форменных элементов. Окрашенные форменные элементы, гидродинамически сфокусированные, проходя через апертуру анализатора, пересекают луч аргонового лазера. При этом происходит рассеивание света, что регистрируется фотодиодом, и возникает флуоресцентное свечение, регистрируемое фотоумножителем (рис. 31 б). Измерение трех видов сигналов дает необходимый объем сведений о каждом форменном элементе, а система адаптивного кластерного анализа позволяет на этой основе определить тип форменного элемента: эритроцит, лейкоцит, эпителиальная клетка, цилиндр, бактерия. Система «флагов» помогает оператору быстро выделить те образцы, которые требуют дополнительного исследования. Эти «флаги» указывают на наличие в моче патологических цилиндров, мелких округлых клеток, дрожжеподобных клеток, кристаллов, сперматозоидов. Результат анализа может быть представлен на экране монитора в графической форме гистограмм и в цифровой форме с отметкой данных, выходящих за пределы нормы (рис. 31 в). Та же информация может быть распечатана. Производительность анализатора - до 100 проб в час. «International Remote Imaging Systems» поставляет автоматизированную систему для комплексного исследования мочи 900UDx Urine Pathology System (рис. 32), состоящую из трех модулей, выполняющих химическое исследование с помощью диагностических полосок, определение относительной плотности мочи и микроскопию ее осадка. При протекании мочи в непрерывном потоке производится запись видеоизображений корпускулярных компонентов осадка, которые обрабатываются компьютером, классифицируются и выводятся на экран монитора для окончательного подтверждения оператором. С этими данными автоматически сопрягаются результаты химического анализа и определения относительной плотности, что в совокупности дает полный профиль исследования мочи. Приборы этого типа рассчитаны на проведение от 50 до 1000 анализов мочи в день (таб. 3).

Таблица 2

Технические характеристики некоторых проточных цитометров

Технические характеристики	Наименование прибора, фирма, страна					
	EPICS XL-, 4XL (MCL), Coulter – Beckman, США	FACS calibur Becton Dickinson США	PAS, Partec, Германия	DAKO Galaxy, DAKO, Дания	Bryte HS, Bio-Rad. США	FCF, Медимакс, Россия
Источник света: -основной; -дополнительный	аргон. лазер нет	аргон. лазер нет	аргон. лазер, ртутная лампа	аргон. лазер 488 нм; ртутная лампа, полупроводн. лазер	ксеноновая, ртутная или ксенонево-ртутная дуговая лампа	ртутная дуговая лампа
-Длина волны света, возбуждающего флуоресценцию, нм	325,350,360,457, 488,514,633	488	488, 350-600,635,670*	635,455*,488, 520,590,630,670*	350-600	
Количество измеряемых параметров*	20, 11 измер. одновременно	6	4-7		4	не менее 4
Число детекторов	до 6: 4-флуоресцентных, 2-светорассеяния	до 6: 4-флуоресцентных, 2-светорассеяния	до 6: 4-флуоресцентных, 2-светорассеяния	6: 2-6 флуоресцентных, 2-светорассеяния	4: 2-флуоресцентных, 2 светорассеяния	3: 2-флуоресцентных, 1-светорассеяния
Размер луча света, мкм	10x90		10x100	10x100		
Размеры проточной кюветы, мкм	250-250, кварц					
Характеристики детектора: -диапазон длин волн, нм; -чувствительность канала флуоресценции, число молекул FITS** или PE** на клетку -минимальный размер клетки, мкм;	300-800 <1000 0,2 (диапазон измер.: 0.2-40)	300-800 <1000 0,2	<1000	<1000	<0,3	
Максимальная скорость анализа, клеток/с	>3300, рабочая – 1000-2000	до 20 000, рабочая -2000	6000	до 30 000	до 30 000	2000, рабочая - 500
Автосамплер	+	+	+	+	+	-
Автоматическая пробоподготовка	+*	-	+	+	+*	-
Автоматическая сортировка клеток: -наличие устройства для сортировки: -макс. скорость сортировки, клеток/с		300	+** 1000			-

Режим анализа в реальном времени.	+**	-	+	+	+	
Возможность автоматической очистки проточной ячейки в процессе анализа.	+	-		+	+	
Возможность изменения логических ограничений (GATE) в процессе работы.	+	+	+	+	+	+
Дисплей и графические изображения в реальном времени	цветной, до 8 одно- или двух параметровых гистограмм, 24 области анализа		цветной, до 6 гистограмм или скаттограмм	цветной, до 8 одно-параметрических гистограмм или 2-параметрических графиков, цветной принтер	дисплей, цветной принтер	
Компьютер:						
-тип,	Pentium	Macintosh	Pentium	встроенный IBM PC на базе процессора Intel Pentium II	Pentium	IBM PC 486
-операционная система;	MS-DOS/Windows	Macintosh	Windows-95/98	Windows 98/NT	Windows	
-программное обеспечение	System II/EXPO	CellQuest	PAS	FlowMax	WinBryte, Modfit DNA, Software	на базе DOS
Основные области применения:						
-иммунология;	+	+	+	+	+	+
-дифференциация популяций лейкоцитов;	+	+	+	+	+	+
-опред. субпопуляционного состава лимфоцитов-иммунофенотипирование лимфоцитов;	+	+	+	+	+	+
-онкология;	+	+	+	+	+	+
-ДНК-анализ;	+	+	+	+	+	+
-микробиология:					+	
-дифференциация бактериальных субпопуляций;					+	

-определение жизнеспособности бактерий;					+	
-идентификация бактерий до вида;					+	
-опред. чувствительности к антибиотикам;					+	
-гематология:	+	+		+	+	+
-автоматиз. рутинных гематолог. анализов;	+	+			+	+
-анализ ретикулоцитов;	+	+	+	+	+	+
-анализ тромбоцитов;	+	+	+	+	+	+
-трансплантология;	+	+	+	+	+	
-анализ хромосом;	+		+	+	+	
-цитология;			+	+	+	+
-другие области применения:						
-анализ спермы;					+	
-анализ фагоцитоза.			+	+	+	
Производительность образцов/ч	60		ок. 60***			ок. 60

Примечания:

*имеются в виду такие параметры, как прямое светорассеяние, угловое (под углом 90°,45°,15°) светорассеяние, боковое сканирование, параметры флуоресценции: логарифмические, линейные, пик время, отношение и др.

**FITC-флуорохром-флуоресценнизотиоцианат.

**-PE(или RPE)- фикоэритрин

EPICS XL-, 4XL (MCL).

*Станции Q-Prep за 30 с,DNA-Prep за 40 с выполняют автоматическую пробоподготовку для фенотипирования лейкоцитов и анализа ДНК. Установка TQ-Prep в сочетании с моноклональными антителами CYTO-STAT позволяет сократить время подготовки образцов:32 образца менее, чем за 19 мин.

**Сбор информации и анализ 8 гистограмм в режиме реального времени.

PAS, Partec.

*В зависимости от дополнительного источника света.

**При установке дополнительного блока – сортера.

**В зависимости от определяемых показателей.

DAKO Galaxy.

*В зависимости от дополнительного источника света.

Bryte HS.

*С помощью системы LISTAFIX используется реактив, позволяющий в течение 30-45с провести процедуру лизирования клеток, не нарушая морфологии лейкоцитов и распределения поверхностных маркеров. Не требуется промывка, центрифугирование образца.

Характеристики цитометров различных типов*

Характеристики	Типы цитометров			
	Проточные анализаторы	Диалоговые ("цифровые") микроскопы	Специализированные автоматические микроскопы	Автоматизированный микроскоп МЕКОС-Ц1
Тип препарата	Суспензия	Мазки, срезы, вытяжки, отпечатки	Сухой мазок (Раритет)	Мазки, срезы, вытяжки, отпечатки
Объем анализируемой выборки клеток	10^4 - 10^7	10^2-10^3	10^2-10^3	10^2-10^3
Анализ малых количеств биоматериала	нет	да	да	да
Скорость обработки (клеток/с)	до 10 000	0,01-10	до 100	1-5
Измерение тонкой структуры и формы клеток	нет	да	нет	да
Измерение структуры тканей	нет	да	нет	да
Число измеряемых признаков клеток	до5 (исследовательские модели – до 21)	до 100	до10	40
Автоматическое распознавание слабоконтрастных границ клеток	нет	нет	нет	да
Автоматическая адаптируемость к препарату	нет	нет/да	нет	да
Визуальный контроль	нет	да	да	да
Обнаружение редких объектов	нет	да	да	да
Доля ручного управления,%	0	20-80	0-5	10-20
Время 1анализа, мин	0,3-1	2-100	5-10	1-4
Тип задачи медицинского автоанализатора	формула распределение признаков	распределение признаков, цитодиагностика, формула	обнаружение редких клеток	распределение клеток, цитодиагностика, формула
Цена прибора (тыс $)	8-100	50-200	250	13-22
Стоимость 1 анализа ($)	0,3-2,0	-	5-10	0,05-0,2

*Таблица составлена:
-на основании данных, представленных директором ЗАО "МЕКОС" Меловым В.С.;
-книга "Исследование систем крови в клинической практике", ред. Г.И.Козинец, В.А.Макаров, Москва, "Триада –Х",1997, стр. 310-311,таблица №33, "Характеристики цитометров различных типов"

Сравнительная характеристика гематологических автоанализаторов

1. Автоанализаторы без подсчета лейкоцитарной формулы

Технические характеристики	Фирма, страна, наименование анализатора							
	Sysmex, TOA Medical Electronics, Германия,Япония		Medonic, Швеция Medonic CA530		ABX Diagnostics, Франция MICROS		Diatron, Австрия	
	K-800	K-4500/K-1000	MIMER	ODEN	8	18	Arcus	Abacus*
Конфигурация -настольная -напольная	+	+	+	+	-			+
Тип детектора: -кондуктометрический; -световой – светоглощ. -лазер-светорассеяние; -радиочастотный; -фаноориметрия; -поляриз. флюоресценции -фотометрия	+ + + +	+ + + +	+ - +	+ + +	- +	+ +	-	
Метод специфич. лизатов		+						
Метод определения гемоглобина: -гемиглобинцианидный -без образования цианметгемоглобина	+ (SLS метод)		+	+	+		+	
Количество параметров: -лейкоциты -гранулоциты -эозинофилы -лимфоциты -моноциты -эритроциты -тромбоциты -ретикулоциты -гемоглобин -гематокрит	8 + + + + +	18 + + + + + + + +	9 - + + - + +	16 + + + + + + - -	8 - + + + +	18 + + + + + + + +	18 + + + + + - - +	

–средн. объем эритроцита	+	+	+	+	+	+	+	
–среднее содержание гемоглобина в эритроците	+	+	+	+	+	+	+	
–средняя концентрация гемоглобина в эритроците	+	+	+	+	+	+	+	
–ширина распределения эритроцитов по объему		+		+		+	+	
–средн. объем тромбоцита		+		+		+	+	
–ширина распределения тромбоцитов по объему		+						
–тромбокрит		+				+	+	
–% крупных тромбоцитов		+						
Гистограммы:								
–количество;		3	3	3	2	3		3
–лейкоцитов;		+	+	+		+		+
–эритроцитов;		+	+	+	+	+		+
–тромбоцитов.		+	+	+	+	+		+
Скаттограммы								
Первичные пробирки для крови:								
–открытые;	+		+	+	+		+	
–закрытые	+				+		+	
Исследуемый объем крови:			20- режим предлюции					
–капиллярной;	40		125-из цельной крови		10		25	20
–венозной;	100*, 200**				10			
–*разведенной*							*60*	
Разведение крови:								
–автоматическое;	+		+		+		+	
–ручное	+		+					
Производительность, проб крови /ч	80 – венозная кровь, 60-капиллярная кровь		50		60		35	45
Реактивы:								
–открытая система;								
–закрытая система	+	+	+	+	+		+	

–калибровочные материалы;	+	+, Cello-check-400, PLT-latex + контр. кровь	+	+	автоматическая калибровка +	+	
–контрольные материалы	+		–	–			
Сист. управл. данными:							
–хранение данных пациентов;		+	последних359 проб крови		+, последний результат	+,1000 результатов**	+ 10000 результатов**
–формирование ответа;	+	+	+		+	+	+
–сигнализация о патологическом результате;	+	+	+		+	+	+
–контроль качества в реальном времени;			+			+	+
–контрольные карты Levi - Jennings;							+
–правила Westgard;							+
–метод ср. арифметических по данным пациентов;			+				
–возможность подсоединения к ЛИС	+	+	+		-	+	+
Дополнит. модули:							
–автомат. подачи пробирок к пробоотборнику		+					
–приставка для отбора проб в автомат. режиме;		+	+				
–считыватель штрих-кода		+	+				***
Автомат. промывка	+	+	+		+	+	
Масса, кг			ок 20		14	15	16

К-4500/К-1000. * Из открытых пробирок.
** Из закрытых пробирок.

Медоник СА530. Автоматическая коррекция результата измерения гемоглобина при большой концентрации лейкоцитов.

Abacus. * Имеет встроенный модуль для быстрого анализа крови животных.
** Включая гистограммы.
***Имеет считыватель штрих-кода как опция.

Технические характеристики	ЗБТК,* Россия Микрон-2000	Beckman Coulter International S.A. США.Франция				Swelab Instruments AB, Швеция AC970 EO	Sysmex, TOA Medical Electronics, Германия, Япония Автомат. счетчик ретикулоцитов, R–2000/R-3000
		A' T 8	A'T10	A'T diff	A'T diff2		
Конфигурация:							
–настольная	+		+			+	+
–напольная							
Тип детектора:							
–кондуктометрический;	+	+	+	+	+	+	+
–световой – светопоглощ.							
–лазер-светорассеяние;							
–радиочастотный;							
–флюориметрия;							+
–поляриз. флюоресценция							
–фотометрия	+	+	+	+	+	+	
Метод специфич. лизатов						+	
Метод опред. гемоглобина:							
–гемиглобинцианидный	+	+	+	+	+	+	
–без образования цианметгемоглобина							
Количество параметров;	21	8	10	18	18	16	6
–лейкоциты	+	+	+	+	+	+	
–гранулоциты	+			+	+	+	
–эозинофилы						+	
–лимфоциты	+		+		+	+	
–моноциты	+		+	+	+	+	
–эритроциты	+	+	+	+	+	+	+
–тромбоциты	+	+	+	+	+	+	
–ретикулоциты							+*
–гемоглобин	+	+	+	+	+	+	
–гематокрит	+	+	+	+	+	+	
–средн. объем эритроцита	+	+	+	+	+	+	

–среднее содержание гемоглобина в эритроците	+	+	+	+	+	+	
–средн. концентрация гемоглобина в эритроците	+	+	+	+	+	+	
–ширина распределения эритроцитов по объему	+			+	+	+	
–средн. объем тромбоцита	+			+	+	+	
–ширина распределения тромбоцитов по объему	+			+	+	+	
–тромбокрит	+						
–% крупных тромбоцитов							
Гистограммы:							
–количество;	3	3	3	3	3	3	
–лейкоцитов;	+	+	+	+	+	+	
–эритроцитов;	+	+	+	+	+	+	
–тромбоцитов.	+	+	+	+	+	+	
Скаттограммы							
Первичные пробирки для крови:							
–открытые;	+	+	+	+	+	+	
–закрытые		+				+	
Исследуемый объем крови:							
–капиллярной;	20	12	12	18	18	20	
–венозной;	150					200	
–разведенной		20	20	20	20		
Разведение крови:							
–автоматическое;	+	+	+	+	+	+	+
–ручное	+						
Производительность, проб крови /ч	60	60 для всех типов анализаторов				40	80
Реактивы:							
–открытая система;							
–закрытая система	+	+*	+*	+*	+*	+	+
–калибровочные материалы;	+калибраторы для калибр. по 1 и 3 точкам	автоматическое выполнение калибровки *				Swelab Calibrator	+
–контрольные материалы	+	+	+	+	+	Swelab Control (16 параметров)	

Сист. управл. данными:						Прогр. AutoCom	
-хранение данных пациентов;	+ для 250 проб крови +	+	+	+	+	+	+
-формирование ответа;	+	+**	+	+**	+**	+	
-сигнализация о патологическом результате;	+	+	+	+	+	+	
-контроль качества в реальном времени;	+	IQAP- программа контр. кач-ва, обеспечивающая стандартизацию исследований				+	+
-контрольные карты Levi - Jennings;				+	+	+	
-правила Westgard;	+					+	
-метод ср. арифметических по данным пациентов;							
-возможность подсоединения к ЛИС	+	+	+	+	+	+	
Дополнит. модули:							
-автомат. подачи пробирок к пробоотборнику							
-приставка для отбора проб в автомат. режиме;						+*	
-считыватель штрих-кода							
Автомат. промывка	+	+	+	+	+	+	
Масса, кг	34	11,5	11,5	14	14	24	

Микрон-2000. *ЗБТК-Зеленоградская биотехническая компания.

Beckman Coulter. *Данные для калибровки прибора содержатся в специальных "карточках управления", прилагаемых к реактивам, они же содержат информацию о реактиве.

**Имеется выбор из 6 различных протоколов представления результатов. В каждом из анализаторов осуществляется трехкратный подсчет клеток и определения их объема. Метод экстраполяции кривой тромбоцитов, используемый при их подсчете, исключает влияние эритроцитов на результаты измерения. Используется запатентованная система "Sweep Flow",исключающая повторное попадание уже подсчитанных клеток в зону подсчета.

AC970 EO. Автоматический пробоотборник обеспечивает эксплуатацию анализатора, не требующую постоянного присутствия оператора. Для подсчета эозинофилов требуется приставка, включающая реактив для счета эозинофилов, автоподогреватель, диспенсер, пробирки, пипетки. Модуль для подсчета эозинофилов может быть подсоединен и к другим типам счетчиков фирмы Swelab.

Автомат. счетчик ретикулоцитов, R –2000/R-3000. *Кроме того, проводится подсчет следующих параметров: LFR - % частиц с низкой флуоресценцией; MFR -%частиц со средней флуоресценцией; HFR - % частиц с высокой флуоресценцией.

2.Автоанализаторы с дифференциальным подсчетом лейкоцитов по 5 популяциям (лейкоцитарной формулы)

Технические характеристики	Наименование автоанализатора, фирма, страна							
	GEN S ™ HmX™ Beckman Coulter International S.A., США		PENTRA 60 120 ABX Diagnostics, Франция	COBAS VEGA, Hoffmann-La-Roche, Швейцария	Excell 22 MWI Inc., США	Cell-Dyn 3500, 3700 Abbott, ILEX, США	NE-1500 SE-9000 TOA Medical Electronics, Sysmex Япония	ADVIA120 Bayer Diagnostics, США
Конфигурация:								
-настольная;	+	+	+	+	+	+	+	+
-напольная								
Тип детектора:			*					
-кондуктометрический;	+	+	+	+	+	+	+	+
-лазер					+(проточ. лазерная цитометр.)	+(проточ. цитометр.)		+
-светорассеяние	+	+						
-под малым углом (1-10°)	+	+			+	+		
-под большим углом (90°);	+	+		+	+	+*		
-световой – светополоц.			+	+	+	+	+	+
-радиочастотный	+	+	+				+	
-флюориметрия				+		+		
-поляризация флюоресценции						+		
Технологии:								
-VCS,	+	+			+	+	+	
-5Diff,	+	+			+	+		
-IntelliKinetics,	+	+						
-AccuGate,	+	+	[1]	[1]				[1]
-цитохимия			+	+				
-специфич. лизатов				+			+	
-MAPSS						+[2]		
Метод определения гемоглобина:								
-гемиглобинцианидный;	+	+		+	+			
-без образования цианметгемоглобина;			+			+	+	

Идентификация образцов крови пациентов	+,штрих-код, введение данных с клавиатуры	штрих-код, ввод данных с клавиатуры	введение порядкового номера с указанием номера серии, штрих-код как опция	штрих-код (для открытых пробирок и штативов)	со встроенной клавиатуры, штрих-код	штрих-код (опция), со встроенной клавиатуры	штрих-код	штрих-код		штрих-код
Кол-тво параметров	29	26	26	26[2], 38[3]	26[1],38[2]	22	25	23	23	более 33
-лейкоциты	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-базофилы,	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-лимфоциты,	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-моноциты,	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-нейтрофилы,	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-эозинофилы,	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-эритроциты	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-гемоглобин,	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-гематокрит,	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-ср. объем эритроцита	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-ср. содержание гемоглобина в эритроците	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-средняя конц-ия гемоглобина в эритроците,	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-ширина распределения эритроцитов по объему	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-ретикулоциты,	+	+	+	+	+		+		+[1]	+
-ср. объем ретикулоцитов	+	+	+	+	+		+		+[1]	+
-коэффициент зрелости ретикулоцитов	+	+	+	+	+		+		+[1]	+
-зрелые ретикулоциты	+			+	+		+			+
-сферичность	+			+	+		+			+
-тромбоциты	+		+	+	+	+	+	+	+	+
-ср. объем тромбоцитов	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-ширина распределения тромбоцитов по объему	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-тромбокрит	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-др. параметры и клетки	клетки экспрессирующие CD4, CD8		атипичные лимфоциты, большие незрелые клетки	атипичные лимфоциты, большие незрелые клетки	атипичные лимфоциты, большие незрелые клетки	бластные клетки	нуклеированные эритроциты; агрегаты тромбоцитов, резистентные эритроциты, крупные лимфоциты	P-LCR	P—LCR, бластные клетки и незрелые гранулоциты	большие неокрашенные клетки, атипичные лимфоциты, бластные клетки, агрегаты тромбоцитов
Стабильность образца, ч	24	24	48		до 48					
Срочные анализы					+без прерыв. серии	+без прерыв. серии	+	+		+
Исследуемый объем крови, мкл -капиллярной; -венозной; -разведенной.	200[1],280[2] 200[1],280[2] 50	185[1],125[2] 185[1],125[2] 50	30[1],53[2] 30[1],53[2]	200[4] 130[5]	200[3],130[4]	180[1],80[2],180[3]	до240[3],130[4],355[5]	200(авт. режим) 40 100		
Автоматическое разведение крови	+	+	+возможно ручное разведение для рутинных, срочных проб и малого объема		+	+	+	+		+
Производительность, анализов/ч	120[3],109[4],50[5]	75[3],30[4]	60	120[4],60[5]	120,60-при работе из откр. пробирки	до75	90	90	120	120
Реактивы: -открытая система; -закрытая система.	+	+	+		+	+	+	+		+
Калибровочные материалы	автокалибровка	автокалибровка	автокалибровка		автокалибровка	автокалибровка, калибровка вручную	автокалибровка	автокалибровка SE – WBC-latex, PLT-latex		+
Контрольн. материалы	+	+	+		+	+	+	NE-check N,L,H	SE-check N,L,H	

Дополнительные модули	автомат. устройство приготовления GEN-S SM и окраски мазков крови				для автомат. подсчета ретикулоцитов	как опция автосамплер и сканнер для считывания штрих-кода; миксер для проб крови на 30 пробирок		автомат. подачи проб, считыватель штрих-кода SE – аппарат авт. приготовления мазка		
Дисплей и графические изображения, гистограммы, скаттерограммы	гистограммы распределения эритроцитов, тромбоцитов		выбор гистограмм для 12, 26 парам.в (в т. ч. 3 програм. гистограммы для эритроцитов,базофилов и тромбоцитов)		гистограммы распределения эритроцитов, тромбоцитов	гистограммы распред. эритроцитов, тромбоцитов, 2цветных скаттерограммы лейкоцитов	цветной дисплей, гистограммы, скаттерограммы	5 гистограмм эритроцитов, тромбоцитов, базофилов, эозинофилов, 2 скаттерограммы		
Система упр. данными: -хранение данных пациентов;	+5000	ок. 2500	>90 000 результатов с графиками:		+	+,до 100000 рез-тов с графиками	до 10000 рез-тов с графиками	300		>10000 рез-тов с графиками
-формирование ответа;	+	+	+		+	+	+	+		+
-сигнализация о патологическом рез-те;	+	+	+		+	+	+	+		+
-автоматическая сист. контроля качества;	+	+	+		+	+	+	+		+
-контроль качества в реальном времени;	+	+	+		+	+	+	+		+
-контрольные карты Levi-Jennings$	+	+	+		+	+	+	+		+
-правила Westgard;			+			+	+	+		+
-метод ср. арифм. по данным пациентов;	+	+	+		+	+	+	+		+
-возможность подсоединения к ЛИС	+	+	+		+	+	+	+		+
Масса, кг	95,5	40	35	90		32,5	86/131 в зависимости от модуля	66,7		

Примечания к таблице «Автоанализаторы с дифференциальным подсчетом лейкоцитов по 5 популяциям»

GEN S ™.

[1] В открытых пробирках.
[2] В закрытых пробирках.
[3] При подсчете лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, определении гемоглобина.
[4] При дополнительном подсчете лейкоцитарной формулы; при автоматическом приготовлении мазков крови – дополнительно 250 мкл.
[5] При дополнительном подсчете ретикулоцитов.

HmX™.

[1] В стандартном режиме работы.
[2] В экономичном режиме работы.
[3] Без исследования ретикулоцитов.
[4] С ретикулоцитами.

PENTRA.

[1] 3 основных принципа измерения: сфокусированный поточный импеданс; цитохимия, и измерение светопоглощения - так называемая технология DHSS.
[2] В случае подсчета общего числа лейкоцитов, лейкоцитарной формулы, эритроцитов, тромбоцитов и соответствующих расчетных показателей.
[3] В случае дополнительного подсчета ретикулоцитов.
[4] Для закрытых пробирок.
[5] Для открытых пробирок.
-MDSS – запатентованная система многоцелевого распределения проб , обеспечивающая коэффициент "переноса"<0,5% для всех параметров.
-Автоматическое немедленное или программируемое повторение анализов в случае получения патологических результатов.

COBAS VEGA.

[1] Без ретикулоцитов;
[2] С ретикулоцитами;
[3] Автоматический метод;
[4] Из открытой пробирки. Первый в мире гематологический автоанализатор, выполняющий автоматический подсчет и ретикулоцитов. Одновременная загрузка до 150 образцов позволяет использовать режим walk-away.

Excell 22.

[1] Обычный режим работы.
[2] Экономный режим.
[3] Режим с использованием автосамплера.

Cell-Dyn 3700.

[1] В том числе и под углом 90° без деполяризации.
[2] MAPPS-многоугловое поляризационное разделение пучка.
[3] Пипетирование из закрытых пробирок;
[4] Пипетирование из открытых пробирок.
[5] При работе с модулем автоматической пробоподготовки.

NE-1500 SE-9000.

[1] Блок RAM-1 для анализа ретикулоцитов.

ADVIA120.

[1] Окрашивание клеток крови в пероксидазной реакции.

Таблица составлена на основании информации, полученной от фирм, а также данных литературы:

Д.А.Шмаров, С.А.Луговская, Е.С. Князева, Г.И.Козинец «Проточная цитометрия в гематологии. Методы и техника проточно-цитометрического анализа.», Клин. лаб. д-ка, 1997г., № 8, с.3-9.
Г.И.Козинец, В.А.Макаров, под ред. «Исследование системы крови в клинической практике.», изд-во «Триада-Х», М. 1997г., с. 259-322.
Hematology Analyzers Automated, ECRI, 1994, 41p.

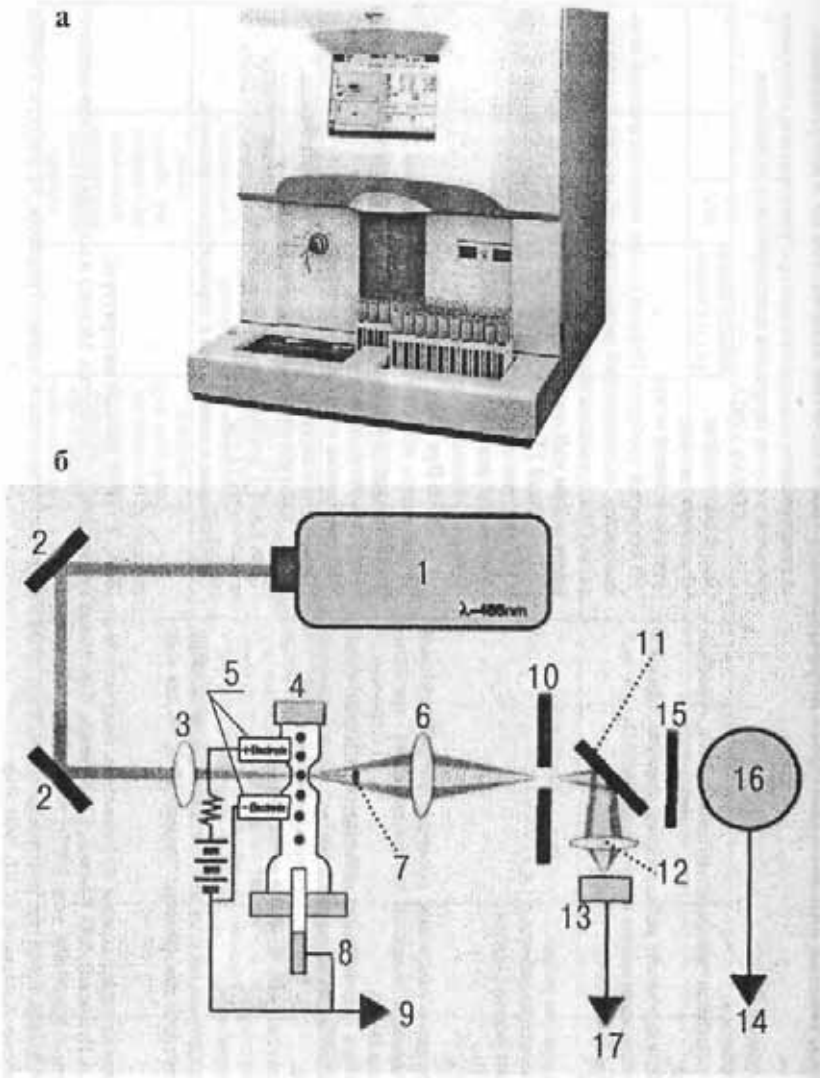
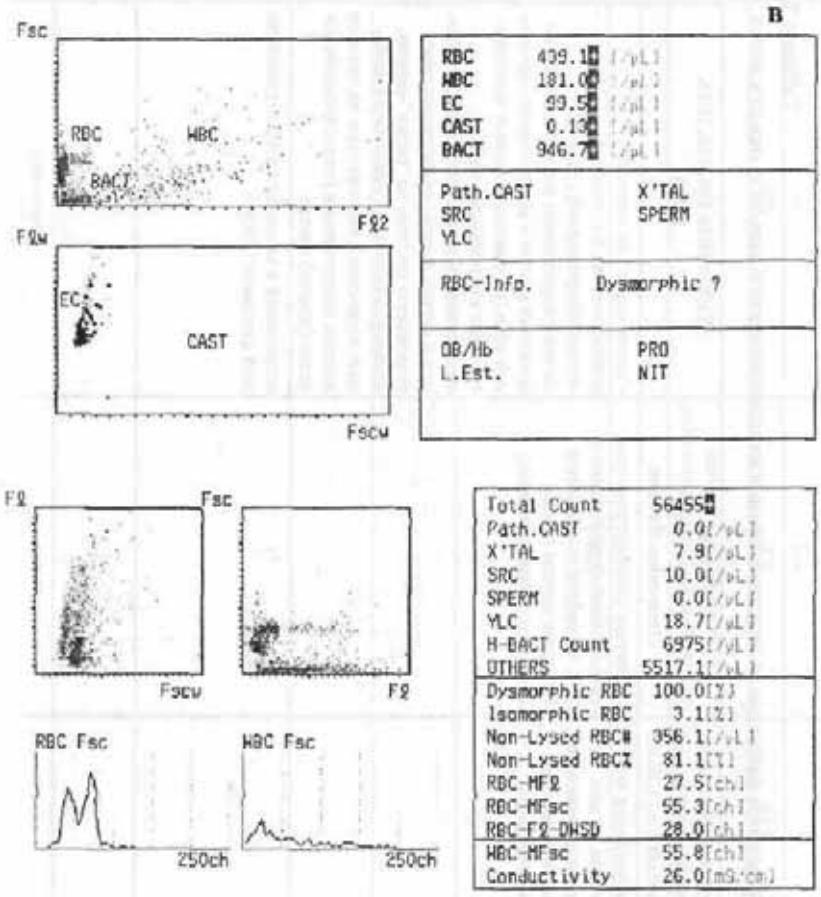


Рис. 31. Автоматический проточный анализатор для исследования осадка мочи UF100 («TOA medical electronics CO., Ltd», «Sysmex»).
а) Общий вид прибора



б) Принципиальная схема устройства прибора: 1. Источник света аргоновый лазер с длиной волны света 488 нм. 2. Зеркала. 3. Конденсорная линза. 4. Проточная камера. 5. Электроды. 6. Коллекторная линза. 7. Разделитель потока света. 8. Датчик проводимости. 9. Усилитель импедансного сигнала. 10 Щель. 11. Дихроичный фильтр. 12. Линза. 13. Фотодиод. 14. Усилитель сигнала рассеянного света. 15. Фильтр. 16. Фотоумножитель. 17. Усилитель сигнала света флюоресценции, в) Образец распечатки отчета об исследовании осадка мочи в виде скаттерограмм, гистограмм и цифровых результатов.

Таблица 3

Сравнительные характеристики некоторых анализаторов для клинического анализа осадка мочи

Наименование, фирма, страна / характеристики	RS 100, 1000, 2000, 2003 DiaSYS Instruments Co., США	UF-100, TOA Medical Electronics, Япония	Yellow IRIS 250, 450, IRIS, США
Принцип работы	Микроскопия оператором 30 мкл суспендированного осадка мочи в проточной кювете*	-проточная цитофлуорометрия, -сканирование флуоресценции ДНК и мембран клеток после облучения светом лазера; -кондуктометрия (импеданс)	-"сухая химия" на полосках, -отражательная фотометрия; -автоматизированный урометр; -автоматизированное распознавание изображений клеток в неотцентрифугированной моче (автоматизированная интеллектуальная микроскопия –АІМ) -автоматическое распределение окрашенных в потоке клеток, проходящих через оптическую систему по "рядам"-рангам, идентификация их изображений с помощью встроенной видеокамеры на цветном дисплее оператором и редактирование им рядов (рангов) клеток.
Отражательный фотометр -источник света -длина волны, нм Поправки: -на цвет мочи; -на мутность мочи		*)	встроенный в автоанализатор отражательный фотометр Clinitek +
Полоска: -закрытая система; -открытая система		+	+
Идентификация проб пациентов		штрих-код	штрих-код
Аналиты: -аскорбиновая к-та; -белок; -билирубин; -глюкоза; -кетоновые тела; -кровь; -лейкоциты (эстераза лейкоцитов); -нитриты; -относительная плотность; -pH; -уробилиноген; -гормоны.		**)	– + + + + + + + + – + + –
Показатели: -цвета мочи; -мутности мочи	- -	- -	- -
Компоненты осадка мочи: -Принцип анализа: -микроскопия; -авт. система распознавания образов; -проточная цитометрия	+ + +	+ +***)	+ +
Возможность построения гистограмм		+	+
Емкость пробонакопителя -шт. полосок -пробирок с мочой		автоматическое поступление проб в пробирках в штативах	
Объем пробы, мл	0,18	0,8	0,6
Возможность исследования разведенной пробы		**)	+

Наименование, фирма, страна / характеристики	RS 100, 1000, 2000, 2003 DiaSYS Instru-ments Co., США	UF-100, TOA Medical Electronics, Япония	Yellow IRIS 250, 450, IRIS, США
Очистка полоски перед исследованием: -требуется; -не требуется		** +	
Время, с -измерения -анализа		72	в зависимости от вида пробы и способа просмотра изображений элементов осадка мочи оператором
Калибровка		Калибратор UF-Check	
Контроль качества		12 файлов для программы контроля качества, 180 точек для каждого количественного параметра	фиксированные эритроциты, контрольная моча
Способ выдачи результата: -дисплей; -принтер; -качественный (+,-); -полуколич (ед.СИ); -количественный -сигнализация о патологическом результате	 +	 + + + +	 + + + + + +
Автоматическое удаление полоски из прибора		+	+

Производительность, -анализов -полосок /ч	ок. 200 мазков	100	20-60 20-60
Интерфейс к компьютеру: -односторонний; -двусторонний	+	 +	+
Хранение данных: -пациентов, -результатов		 1000 результатов, включая скеноограммы и гистограммы	+ +
Масса, кг		137	110

Примечания:

RS 100, 1000, 2000, 2003 DiaSYS Instru-ments Co., США. Полуавтоматические системы.

*Проточная кювета имеет станд. размеры, позволяющие микроскопировать постоянный объем пробы независимо от свойств осадка мочи и вязкости пробы. Могут быть использованы различные микроскопы, включая фазово-контрастный и для работы вполяризованном свете. Для подсчета элементов осадка мочи на дне кюветы выгравированы 3 решетки по 1 мкл (опция).

UF-100,TOA Medical, Electronics, Япония. Автоанализатор.

*) имеется возможность подключения отражательного фотометра on line

**) в соответствии с возможностями подключенного отражательного фотометра;

***) сочетание нескольких аналитических технологий:

-измерение импеданса – кондуктометрия;

-окраска ДНК, мембран форменных элементов флуоресцирующими индикаторами, измерение и сканирование флуоресценции под воздействием луча лазера, сканирование светорассеяния; многопараметровый анализ этих показателей.Исследование проводится в неотцентрифугированной моче.

Yellow IRIS 250, 450, IRIS, США. Автоанализатор.

Требуется удаление слизи из мочи.

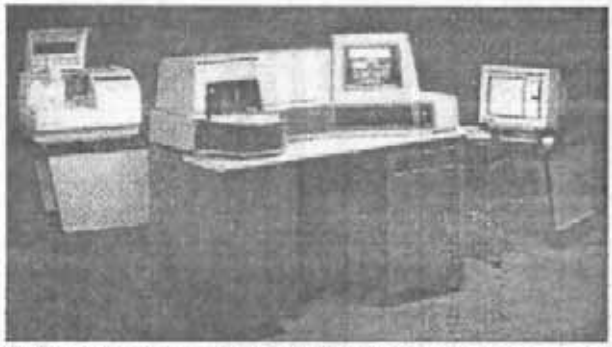


Рис. 32. Автоматизированная система для комплексного исследования мочи 900Udx Urine Pathology System («IRIS», США).

Разработка различных вариантов **методов специфического связывания** (или лигандных методов) побудила к конструированию многообразных **автоматизированных устройств** для выполнения этих технологий. Одним из характерных свойств этих методов является необходимость добавления к биоматериалу агента(антитела, олигонуклеотида), специфически связывающего аналит и меченого меткой того или иного рода - радиоактивным изотопом, ферментом, флуорохромом, хемилюминесцентной меткой. В зависимости от варианта технологии - конкурентное или неконкурентное связывание, метод одинарных или двойных антител, микроточечное иммуноисследование или микроточечный зонд - в состав блоков автоматического анализатора должны входить: устройство распределения проб биоматериала, устройство для дозирования связывающего агента (если он заранее не закреплен в реакционной емкости: пробирке, лунках планшета), устройство для отмывания планшетов. Для детекции радиоактивной метки в радиоиммунных и иммунорадиометрических методах используются сциптилляционные счетчики, в иммуноферментных методах - фотометры, в иммунофлуоресцентных методах - флуорометры, в иммунохемилюминесцентных - люминометры. Поскольку в анализаторах, предназначенных для выполнения иммуноферментных исследований, нередко процесс связывания аналита с антителом и меткой происходит в лунках планшета, детекция и измерение результата осуществляется с помощью вертикальной фотометрии. Программы компьютерной обработки данных в этих приборах особенно сложны, так как должны учитывать большое число факторов и использовать калибровочную кривую Кенделя-Гендерсона.

Для выполнения иммунохимических исследований в лабораториях различной мощности фирма «Roche Diagnostics» предлагает семейство анализаторов ES 33, ES 300, ES 700, позволяющих определять до 40 различных параметров, относящихся к сферам интересов инфектологии, эндокринологии, кардиологии, онкологии, аллергологии, акушерства. Специализированной системой для автоматизированного аллергологического иммуноанализа является UniCAP 100 («Pharmacia & Upjohn», Швеция).

Наряду с упомянутыми выше автоматическими анализаторами для иммуноферментного анализа (см. разделы « Методы специфического связывания» и «Комплексное оснащение и механизация») в качестве примера автоматического иммуноферментного анализатора для работы с микропланшетами может быть представлена ВААМС-2 (Work Area Automated Microplate System, «Sanofi Pasteur»), в основе конструкции которой использована «механическая рука» - высокоточный трехкоординатный робот. Система состоит из 1 - 4 технологических модулей, каждый из которых включает автосемплер, дилютор-диспенсер, шейкер-инкубатор, промыватель, считыватель, робот-манипулятор, систему питания. Поскольку система ВААМС-2 предназначена для выявления ВИЧ-инфекции, в ее конструкции особое внимание уделено безопасности для персонала. Каждый модуль выполнен в виде стойки с защитным прозрачным кожухом, исключающим контакт оператора с биологическим материалом, Все технологические операции проводятся в закрытом изолированном пространстве, использование одноразовых наконечников исключает возможность переноса.

В полностью автоматизированном иммунохемилюминесцентном анализаторе Access («Sanofi Pasteur») (рис.33 а) используется метод непрямой хемилюминесценции (рис. 33б) (высокая стабильность диоксетанового субстрата, возможность синтеза конъюгата щелочной фосфатазы с разными типами молекул, широкий диапазон измерения, например, для IgE от 0,5 до 3000 МЕ/мл) с парамагнитными частицами в качестве твердой фазы (гомогенизация твердой фазы с помощью ультразвука, промывка с использованием магнитного поля, увеличение площади реакции до 7,5 см^2, максимальная чувствительность - до 0,006 для ТТГ, минимальное неспецифическое связывание, средний объем пробы 50 мкл, быстрая кинетика реакции - среднее время получения первого результата 25-30 мин.) при производительности 100 тестов в час.

Произвольный доступ допускает выбор для каждого исследуемого образца биоматериала (одномоментная загрузка прибора - 6 штативов по

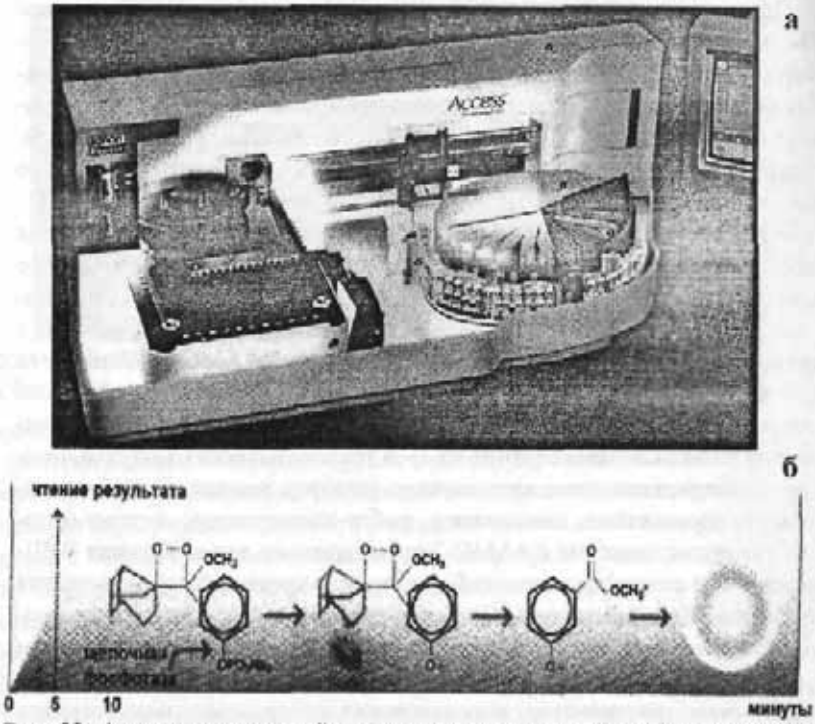
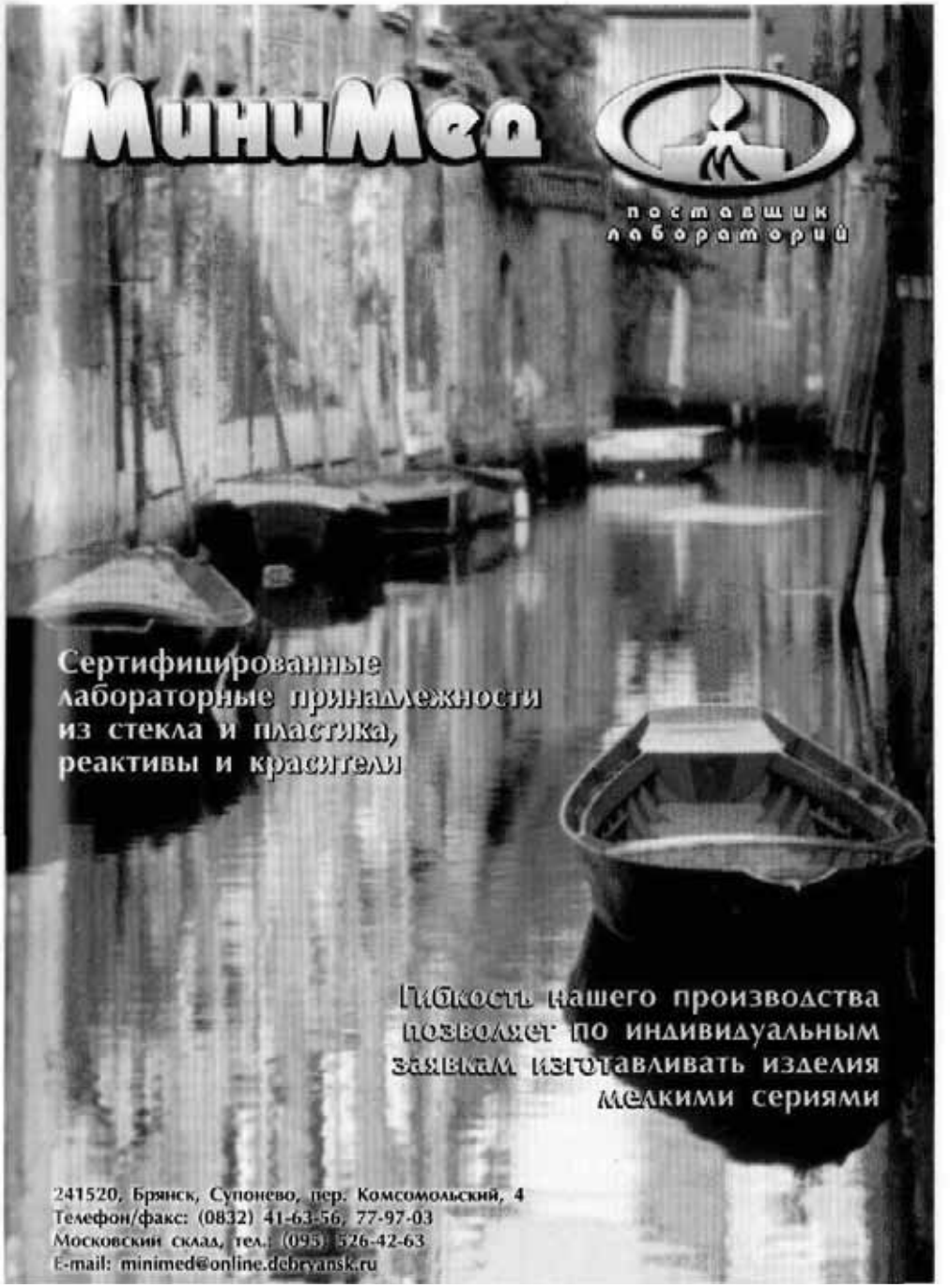


Рис. 33. Автоматизированный иммунолюминесцентный анализатор Access («Sanofi Pasteur»), а) Общий вид прибора, б) Принцип иммунохемилюминесцентной реакции, используемой в приборе.

10 образцов каждый) любого перечня тестов из 24 имеющихся в приборе наборов реагентов, а всего с помощью Access может быть выполнено 49 лабораторных тестов, применяемых при эндокринной, сердечно-сосудистой, онкологической, гематологической, аллергологической, инфекционной патологии и лекарственном мониторинге.

Высокие аналитические возможности иммунохемилюминесценции реализованы также в автоматическом анализаторе свободного доступа Immulite («DPC», США), использующем не микропланшеты, а пробирки в качестве реакционных емкостей. На рис. 34 представлена схема процесса определения в приборе.

На автоматизированное выполнение блот-тестов рассчитана система ДЕСИЛАБ («Sanofi Pasteur») (рис. 35).


МиниМед
поставщик лабораторий
Сертифицированные лабораторные принадлежности из стекла и пластика, реактивы и красители
Гибкость нашего производства позволяет по индивидуальным заявкам изготавливать изделия мелкими сериями
241520, Брянск, Супонево, пер. Комсомольский, 4
Телефон/факс: (0832) 41-63-56, 77-97-03
Московский склад, тел.: (095) 526-42-63
E-mail: minimed@online.debryansk.ru

v.labmetod.ru

ЛабМетод

МЕДИЦИНСКОЕ ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, ТЕСТ-СИСТЕМЫ, РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, СЕРВИСНОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

РАЗДЕЛАМ:

инническая биохи- полуавтоматы Е и серии автоматов VTO, PRONTO UTION, ELECTA 216 водства BioSed; рсальные спектро- ометры фирмы ronic Instruments

матология: анализаторы ы Meditronic Diagnostics диапазон ителей от 4 до 19 параметров, автоматы окрашивания, микроскопы и системы из

инническая иммунология: полуавтоматические и автоматические ридеры европейского производства, реагенты и тест - ы для определения апоптоза, цитокинов и их торов, антител, реактивы для молекулярной биологии водства фирмы R&D;

олекулярная диагностика: оборудование Thermo id, реактивы для определения микроорганизмов, ения наследственных болезней, онкодиагностики, трансфузиологии, идентификации личности

икроскопия: микроскопы Nikon для исследований в одящем и отраженном света, системы анализа ижения Lucia, Genikon;

анение реактивов и биообъектов: низкотемпературные ильники и холодильники для банков крови, программные замораживатели и контейнеры на ве жидкого азота Cryotec,

ультуральные исследования: CO2 - инкубаторы и ламинары фирмы Thermo Forma; рифуги Thermo IEC, ламинарные боксы Kojair, пластик Costar

пологическая анатомия: оборудование для моргов, лабораторий патогистологии, лоцитохимии завода Thermo Shandon, DAKO, Ventana Medical Systems

инническая цитология: цитоцентрифуги Cytospin 4, наборы для автоматического и ого окрашивания, принадлежности и расходные материалы, напольные и электронные архивы, итрасы, АРМ-цитолога

бор материала: пункционные биопсийные иглы Gallini с эхомарками

ойка и обеззараживание: автоматические мешалки DEKO для всех видов лабораторной ды,стекла и принадлежностей фирмы Franke, ультразвуковые мойки, стерилизаторы

121359, Москва, а/я 5,
ул. Маршала Тимошенко 19, оф. 243
тел. (095) 721-0558, 415-0975, факс. 141-9875,

Технические характеристики некоторых автоматических анализаторов для иммунохимических исследований представлены в табл. 4.

При автоматизации методов исследования свертывающей и противосвертывающей систем крови предусматривается использование всех видов аналитических технологий, известных в коагулологии: клоттинговых, хромогенных и иммунологических. Соответственно в конструкции автоматических коагулологических анализаторов должны быть представлены устройства или блоки для реализации этих технологий: устройства для вращения шариков в тестовых пробирках и детекторы, регистрирующие время прекращения этого вращения в результате образования сгустка крови; дозаторы для добавления хромогенных реагентов и фотометрические детекторы, комплекс устройств для иммунохимического исследования. Примером такого прибора может служить STA Compact («Roche Diagnostics», Швейцария), способный реализовать до 80 программируемых тестов системы свертывания, включая протромбиновое время, АЧТВ, факторы внешнего пути активации (II, V, VII, X), факторы внутреннего пути активации (VIII, IX, XI, XII), фибриноген, протеин С (клотинговым и хромогенным методами), гепарин, тромбиновое время, плазминоген, APC резистентность, рептилазное время, фактор Виллебранда, антитромбин III, Д-Димер. Производительность прибора - до 150 тестов в час (рис. 36).

В семействе коагулологических анализаторов Thrombolyser Compact, Thrombolyser Rack Rotor, Thrombolyser Combi («Behnk ElektronikУ, Германия) применяется единая технология с использованием общей кюветы, куда дозируются проба и реагенты и где они одновременно инкубируются, не смешиваясь, после чего при помещении в измерительный блок и перевороте кюветы на 90° происходит их смешивание до гомогенной смеси с помощью стального шарика (рис. 37). Связывание шарика с нитями фибрина позволяет точно документировать время образования сгустка (таб. 5).

Основой **автоматизации микробиологических исследований** является учет различных свойств микроорганизмов: особенностей их строения, роста и образования культур; биохимических свойств - ферментативной активности, особенностей метаболизма; чувствительности к воздействию антибиотиков; антигенного состава .

Средства автоматизации предлагаются для различных этапов микробиологического анализа как при идентификации различных микроорганизмов, так и для определения их чувствительности к антибиотикам.

Автоматический счетчик колоний микроорганизмов в чашках Петри и многолуночных планшетах ProtoCOL XR («Synbiosis», Англия) скани-

Таблица 4

Автоанализаторы для иммунохимических исследований

Технические характеристики	Наименование анализатора, фирма-изготовитель, страна										
	Vitros Eci Ortho-Clinical Diagnostics, Jonson & Jonson, США	DPC IMMULITE/IMMULITE 2000, DPC, США	TDx	IMx, IMx SELECT	AxSym	Architect * i 2000, i4000, i6000, i8000	Elecsys 1010	Elecsys 2010	Cobas COREII	ACS –180 Plus, Chiron, США	Access, Beckman/ Sanofi Diagnostics Pasteur, США
			Abbott Diagnostics, США				F.Hoffmann LaRoche, Швейцария				
Конфигурация: -напольная, -настольная	+	+IMMULITE 2000 +IMMULITE	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Принцип работы: -дискретный; -центрифужный; -селективный; -с жесткой прогр. (серийный); -выбор проб для анализа в произв. послед. (random access)	+ + + непрерывн.	+/+ +/+ + непрерывн.	+ + -	+ +	+ + +	+ + + непрерывн.	+ + + непрерывн.	+ + + непрерывн.	+ +по пац. + +	+ +по пац. + +	+ + + непрерывн.
Принцип измер. –фотометрия, -турбидиметрия, -нефелометрия, -электрохим., -хемилюминометрия -поляризация флуоресценции,	+усиленная	+	+ +	+	+	+	+зл.хемилюминесценция	+зл.хемилюминесценция	+	-	+

-флуоресценция -разреш. во врем. флуоресценции				+	+						
Источник света, длины волн: -фотометрии, нм; -флуоресценц, нм: -возбуждения, -флуоресценции; -хемилюминесц.		не нужен	вольф.-галоген. лампа 485 525-550	ртутная, вольф.-галоген. лампа 365рт.лам, 448вольф. лам. 450рт.лам, 535вольф. лампа	ртутная, вольф.-галоген. лампа 365рт.лам, 448вольф. лам. 450рт.лам, 535вольф лампа		620	620	492/650	не требуется	не требуется
Принцип метода: -гомогенный иммуноанализ; -конкур. белковое связывание -ИФА: -лиганд; -тип твердой фазы; -субстрат; -фермент	+ ПОД микролунки люминол ПОД	+ ЩФ полистироловые шарики LUMIGEN* ЩФ	+ флуоресцеин -	МИФА, ФИИА, захват ионов + + + ЩФ латексн. микрочцы Ø<0,5 мкм* 4-метилумбеллиферилфосфат ЩФ	МИФА, ФИИА, захват ионов + + + ЩФ латексн. микрочцы Ø<0,5 мкм*ы 4-метилумбеллиферилфосфат ЩФ	магнитные частицы акридин-(N-сульфонилкарбоксамиды)	трис-(бипиридил)-Ru^{2+}-хелат магнитные микрочастицы*	трис-(бипиридил)-Ru^{2+}-хелат магнитные микрочастицы*	+ ПОД полистироловый шарик о-фенилендиамин ПОД	магнитные частицы эфиры акридина	- ЩФ магнитные частицы диоксетан ЩФ

Технические характеристики	Наименование анализатора, фирма-изготовитель, страна										
	Vitros Eci Ortho-Clinical Diagnostics, Jonson & Jonson, США	DPC IMMULITE/IMMULITE 2000, DPC, США	TDx	IMx, IMx SELECT	AxSym	Architect * i 2000, i4000, i6000, i8000	Elecsys 1010	Elecsys 2010	Cobas COREII	ACS -180 Plus, Chiron, США	Access, Beckman/ Sanofi Diagnostics Pasteur, США
			Abbott Diagnostics, США				F.Hoffmann LaRoche, Швейцария				
-усилитель люминесц.(для хемилюминесц.); -детекция	усилители люминесценции	ЩФ фотоумножитель	изм. угла возбужд. света флуоресценции	фотоумножитель	фотоумножитель		фотоумножитель	фотоумножитель		фотоумножитель	фотоумножитель
Режимы измер.: -конечная точка,		+/+	+	+	+	+			+	+	+
-кинетический;			+	+	+	+	20 измер. за 0,4с	20 измер. за 0,4 с			2/3-точ. кинетика (от метода)
-2 точки, кинетика; (фикс. вр.)				+	+						
-двуволн. измер.									+		
-многоволн. измер.											
Аналиты. -гормоны:	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-оценки функции щит. железы;	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-половые;	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-гипофиза,	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
-надпочечников;	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- подж. железы;		+		+	+	+	+	+	+	+	+
-онкомаркеры;	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
/ТОРСН-инфекции;	+	+			+	+	+	+	+	+	+
-марк. гепатитов;	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
-маркеры ВИЧ;	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
-лекарства (лек. мониторинг);	+	+	+*	+	+	+	+	+	+	+	+
-марк. и токс. вещества;	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
-цитокины;		+									+
-марк. анемии;	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
-марк. поврежд. серд. мышцы;	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
-прямое опр. ДИК и РИК;											
-аллергены;	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
-специфические белки;	+	β_2-микроглобулин, ферритин	+С-реакт. белок, трансферрин	+, β_2-микроглобулин	+, β_2-микроглобулин	+	+	+	+	+	+
-другие аналиты.	остеокальцин PAPP-A, анти-K,N-телопептид	индикатор резорбции костей, дезоксипиридинолин Д		гликогемоглобин	гликогемоглобин	гликогемоглобин	маркеры повреждения костной ткани, гликогемоглобин	гликогемоглобин	антитела к Jo1;SSA/RO52,-SSA/RO60, SSB/La, Sci 70, dsDNA, RNP,Sm – к кардиолипину	деоксипиридинолин	фолат эритроцитов
Срочн. анализы: -без прер. серии;	+	+/+			+(<15мин)	+	+	+	+	+,пробирки марк. штрих-кодом	+
-с прер.ы серии											
Производительн. исследований/ч	90	до 120/ до200	60	40-50* (ср.48)	80-120	200-800 от кол-ва модулей	60	88	150	180	25-100 от теста
-вр. получ. первого ответа от мом. поступл. первой пробы в ан-тор мин;	15-45	42-72/ 35-65	5	15	8-30	29	9-18	9-18	30-120 от теста	15	15-55 от теста
-время получ. рез-та каждой послед. пробы, с.		30	ок.50 (20 обр.иссл. за 22мин)		60	18				20	

Технические характеристики	Наименование анализатора, фирма-изготовитель, страна										
	Vitros Eci Ortho-Clinical Diagnostics, Jonson & Jonson, США	DPC IMMULITE/IMMULITE 2000, DPC, США	TDx	IMx, IMx SELECT	AxSym	Architect * i 2000, i4000, i6000, i8000	Elecsys 1010	Elecsys 2010	Cobas COREII	ACS –180 Plus, Chiron, США	Access, Beckman/ Sanofi Diagnostics Pasteur, США
			Abbott Diagnostics, США				F.Hoffmann LaRoche, Швейцария				
Кол-во прогр. анализов (методов)	более 50	более 100	>65	>60	>60	95	>60	>60	> 65	ок.50	более 70
Количество одновременно выполняемых тестов на 1 биожидкость пациента	до20	DPC IMMULITE**, до 5,через 2 мин возможно повт., взятие пробы из той же пробирки на следующ. гр. из 5 ан.; IMMULITE 2000-24	1	1-IMx 3-IMx SELECT	20	25	6	15	18	13	24
Емкость пробоприемника, количество мест для биожидкостей пациентов, не включая позиции	60	пробы пост. послед в цепи, в IMMULITE 2000-90, но кол-во биожидкостей для исслед. в зоне загрузки неогр.	до20 на 1карусель	24 для МИФА и 20 для ФПИА	60 первичных пробирок, 90 чашечек для образцов	до125 для i2000; до 250 для i4000-i8000	24	30 при испол. пробоприемнике в виде диска, 100 –при испол. штативов	дозагрузка проб в штативах без прер. анализа	60 чашек для биожидкостей располагаются в карусели	60 (6 лотков по 10 пробирок)
-для срочн. ан.;							2			+	
-калибровочных проб;	в любом месте,2-3 поз							в любое вр., в любой поз.		+	
-контр. проб; -спец. проб							2	2	6	+	
Биожидкости: -сыворотка,	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-плазма,	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-моча,	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-другие биожидкости		цельная кровь	СМЖ, цельная кровь	СМЖ	СМЖ, цельная кровь	СМЖ цельная кровь					СМЖ, выд. из органов мочеп. сист., цельная кровь
Детекция образ. сгустка в биожидк.	+	+IMMULITE 2000			-	+	-	+	+	+	-
Идентификация биожидкостей	автомат., любой штрих-код	автомат., штрих- код	вручную с клавиатуры, штрих-код			штрих-код	штрих-код для реагентов, калибраторов и образцов		штрих-код для штативов и обр-ов	все штрих-коды	штрих-код
Пробы:объем, мкл.	10-80	5-100, 20-50	50-200	150 для МИФА 50 для ФПИА	50-200	50-200	10-50		3-?	10-200	5-200, ≤ 50
-типичный,мкл;											
-автоматическое разведение проб;	+	-/+пре- и постанализ.	+	+пре- и постанализ.	+пре- и постанализ.	+пре- и постанализ.	+		+	+	+
-автомат. конц. проб;					+						
-"перенос" при пипетировании, %	исключен вследствие исп. одноразов. наконечников для дозир. образцов	отсутствует при опред. экстраполя коэф. "переноса"0,154% (J.Rodriguez -Espinosa, 1998)	<1,5	0,0002-0,006	практически отсутствует	практически отсутствует	практически отсутствует из-за использования для пипетирования одноразов наконечн.			практически отсутствует	практически отсутствует
Реактивы: -откр. система;											
-закр. система;	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
-объемы реактивов, мкл;		от 50					30-80, до 180 для разведл., 15+3для разбавит и др., 6 контр.		10-470	50-450	-

Технические характеристики	Наименование анализатора, фирма-изготовитель, страна										
	Vitros Eci Ortho-Clinical Diagnostics, Jonson & Jonson, США	DPC IMMU-LITE/IM-MULITE 2000, DPC, США	TDx	IMx, IMx SELECT	AxSym	Architect * i 2000, i4000, i6000, i8000	Elecsys 1010	Elecsys 2010	Cobas COREII	ACS –180 Plus, Chiron, США	Access, Beckman/ Sanofi Diagnostics Pasteur, США
			Abbott Diagnostics, США				F.Hoffmann LaRoche, Швейцария				
-количество реактивов в модуле для реактивов;	20	от 50 12/24	1упаковка	IMx-1уп-ка, IMx-SELECT-3 уп-ки	20	25			18	26 для 13 методик	24 на 24 методики
-охлаждение реактивов при хранении в анализаторе;	реактивы в холодильнике на борту стабильны до 60 дней	+/+	открытые реактивы стабильны на борту 60 дней	открытые реактивы стабильны на борту 60 дней	открытые реактивы стабильны на борту 112 ч	+	блоз. контр. t=17-23°C, реактивы стабильны на борту до 8 нед.			-, средняя стабильн. реактивов на борту 40 ч	+ срок стабильн. вскрытых реактивов на борту до 28 дней*
-сигнализ. об нетощ. реактивов;	+	+/+	+		+	+	+	+		+	+
-количество реактивов на 1 анализ.		2/3	1упаковка жидких реактивов	IMx: для методов МИФА в 1уп. 4реакт., для ФПИА-3; IMx SELECT: в 1 уп.-3 реакт.						2(1–магн. ч-цы с иммобилиз. антителами к иследед. компоненту или антигены; 1- дозируется непосред. в кюветы в измерит. камере люмином-ра)	
Сосуды для реакций:											

-пробирки (кол-во,шт.)		+входит в сост. набора реакт.	+для реакций	ячейки для реакций	ячейки, 90, для реакций	пробирки, 1200,в карусели	+	+	+		отдельные кюветы
-планшеты, кол-во,шт											
-кюветы			измер-ая, пробирка	измер-ая, пробирка	измер-ая, пробирка					250 кювет в штативе, для провед. реакции и хемилюминометрии**	
Калибровка: -средний интервал,ч,	до4-х недель	от метода - от 1 до 4 недель	1-4месяца от метода	мин.14 дней	мин14 дней		до 8 недель	до 8 недель	до 6 недель	от метода от 7до 28 дней, для [illegible]	14-28 дней от метода
Способ:											
-по 1 калибр. р-ру;				+					+рекалибр.		
-по 2 калибр. р-ям;	2-3 раствора	+****в сост. набора реактивов			+**	+**	+рекалибр.	+рекалибр.	+рекалибр.		
-по калибр. кривой;		+	+	+	+	+				+рекалибр.	+6 калибр. р-ров
-по фактору;										+***	
-автомат. развед. осн. калибр. р-ра;					+		+	+	+	+	
-автомат. коррекция смещ. калибр.		+	+	+	+	+	+	+		+	
Методы расчета:											
-линейн. зависимость;		+				+					
-нелинейная калибр. кривая;		+				+					
-метод наим. квадратов		+									
-от точки к точке;			+								
-кубистич. сплайн;										+	
-logit-log –4;			+								

Технические характеристики	Наименование анализатора, фирма-изготовитель, страна										
	Vitros Eci Ortho-Clinical Diagnostics, Jonson & Jonson, США	DPC IMMULITE/IMMULITE 2000, DPC, США	TDx	IMx, IMx SELECT	AxSym	Architect * i 2000, i4000, i6000, i8000	Elecsys 1010	Elecsys 2010	Cobas COREII	ACS –180 Plus, Chiron, США	Access, Beckman/ Sanofi Diagnostics Pasteur, США
			Abbott Diagnostics, США				F.Hoffmann LaRoche, Швейцария				
-logit-log -5			+?								
Контрольные материалы	+	наборы контр мат. по всем гр. аналитов	набор контр. мат.-Abbott Control Kit	набор контр. мат.	набор контр. мат.	набор контр. мат.	+	+	+	+	+
Термостатир.,**С;	37 °С	37°С±1°С	37 °С	37 °С	37 °С	37°С	37°С	37°С	37°С	37°С±0,5°С	37°С
Встряхивание		+пост., для увелич. скоростреакции	+	+	+	+				+	ультразвук. перемешивание
Промывка пробирок или планшетов в ходе реакции	+	+		+	+	+				+	+с исп. магнитного поля
Возможн. подсвоч. линии для транспортировки проб		-/+для IMMULITE 2000	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Сист. упр. результами:											
-долговр. хранение данных пац., калибр. контр. кач-ва;	+	+		данные пац. с 8 каруселей с биоматер.	+	+	+	+	+	+	+
-автомат. контр. кач-ва:	+	+			+	+	+	+	+	+	+
-в режиме реальн. вр.;	+	+			+	+	+	+	+	+	+
-постр. контр карт Levi-Jennings,	+	+			+	+	+	+	+	+	+
-правила Büttner										+	
-множеств. правила Westgard;	+	+			+	+	+	+	+	+	+
-сост. сводного бланка рез-тов для пациента;	+	+			+	+	+	+	+	+	+
-возможн. введ. в бланк рез-тов, получ. вне анализат.;										+	
-распечатка рез-тов на внешнем принтере;	+	+				+					
-сообщ. о патолог. рез-те;	+	+					+	+	+	+	+
-отчет о рез-тах;		+									
-интерфейс к ЛИС		+				+	+	+	+	+	+
Потр. дистил. или деминерал. воды, л/ч		ок.5мл на 1 анализ	практическти отсутствует							2,6 л на 200 ан-ов	практич. отсутствует
Масса, кг		108	41	43	?	?	110	170, 210-версия со штативами	110	160 –баз. сист. +36 – интерфейс польз-ля	91

Принятые сокращения:
ПОД-пероксидаза
ЩФ-щелочная фосфатаза
МИФА-иммуноферментный анализ на микрочастицах
ФПИА-флуоресцентный поляризационный иммуноанализ
CMIA-Chemiluminescent Magnetic Particle Immunoassay-хемилюминесцентный иммуноанализ на магнитных частицах.

Примечания:
Vitros Eci.*Реактивы содержат антиинтерференционные материалы.
**Вся необходимая информация о методе и реактивах вводится с помощью магнитных карточек (технология "a la carte").

DPC IMMULITE/IMMULITE 2000. Работа анализатора основана на принципе конкурентного твердофазного хемилюминесцентного иммуноферментного анализа. Несвязавшийся с антителами на шариках ферментный конъюгат удаляется в автоанализаторе промывкой при центрифугировании при вращении пробирки по вертикальной оси. Исследуемая проба может быть добавлена на любом этапе анализа в любое время. Вся необходимая информация о методе, реактивах вводится с помощью штрих-кода.
*Метокси-4-(3-фосфато-фенил)-спиро-(1,2-диоксетан-3,2-адамантан).
**В зависимости от количества циклов в процессе анализа. При необходимости в одной и той же биожидкости через несколько минут можно определить другой набор из 5 аналитов.

***Для выполнения большего числа анализов рекомендуется использовать несколько съёмных карусеней для реактивов. Одновременно в приборе может находиться до12 реактивов (2-бтестов).

****Первоначально калибровочная кривая, соответствующая серии реактивов, вносится в память анализатора путем считывания штрих-кода. Далее автоматическая коррекция калибровочной кривой осуществляется по 2 калибровочным растворам, исследуемым в аналитической серии в соответствии с интервалом для данного метода, что обеспечивает высокую точность результатов и экономию реактивов.

TDx. *Противосудорожные, антиастматические, антиаритмические, противоопухолевые препараты, антидепрессанты, антибиотики, сердечные гликозиды, барбитураты, морфин и др.

TDx,Imx,Imx SELECT,AxSym. 2 технологии-МИФА и ФПИА- позволяют определять аналиты с низкой и высокой молекулярной массой. Микрочастицы суспендированы в растворе и дозируются пипетирующей системой, усиливают реакцию. После образования "сэндвича" конъюгат-аналит-антитело (или антиген), он захватывается стекловолоконной матрицей. Микрочастицы плотно прилегают к ней и таким образом связанный с антигеном аналит отделяется от несвязанного.

*Имеется вариант технологии, в котором микрочастицы заменены растворимым полиамином, ковалентно связывающимся с захватывающей молекулой (антигеном, антителом и др.)-технология ион-захвата (ion-capture). В зависимости от технологии, оператор помещает пробирку с биожидкостью в соответствующий картридж с реактивами. МИФА и ФПИА технологии выполняются раздельно, а не в одной серии.

**Калибровочная кривая вводится с помощью специальной карты.

Architect. Семейство автоанализаторов. Первым из них является Architect i2000.Конфигурация имеет модульную структуру, максимальное количество модулей-4-Architect i8000,-управляемую 1 оператором. Используемая хемилюминесцентная технология с гибким программированием носит название CHEMIFLEX и представляет собой неконкурентный иммуноанализ. Кроме того, семейство включает и модуль для выполнения биохимических исследований. Иммунохимические тесты включают технологии с 1 и 2 промывками в ходе реакции, что уменьшает значения холостых проб, интерференцию, значительно повышает чувствительность.

Elecsys1010 Elecsys 2010. *Гетерогенный иммуноанализ. Используется стрептовидин-биотиновая технология, рутениевый хелат, обладающий высокой стабильностью и прикрепляющийся к магнитным микрочастицам, платиновые электроды, электрохимическое окисление кофактора - трин- n-пропиламида (TPA) в TPA-катион-радикал, являющийся сильным восстановителем, который используется для генерации возбужденного состояния Ru2+. Циклическая амплификация сигнала. Могут быть выполнены 1-,2- и 3-х ступенчатые иммуноанализы.

Cobas CORE II. Возможно использование первичных пробирок для взятия биожидкости различных изготовителей: вакутейнеров на 5,7,10 мл, пробирок типа Eppendorf и типа Roche Biocup.

ACS-180 Plus. *Идентификация кювет видов проб с помощью штрих-кода;

**Кюветы удаляются и автоклавируются.

***Калибровочная кривая для каждого набора реактивов строится изготовителем и хранится в памяти специальной карты, прилагаемой к набору. Chiron производит также 3 набора многокомпонентных калибраторов.

Access. *Высокая стабильность вскрытых наборов реактивов обеспечивается не только охлаждением реактивов на борту, но и наличием самозаклеивающейся пленки, закрывающей картридж с реактивами.

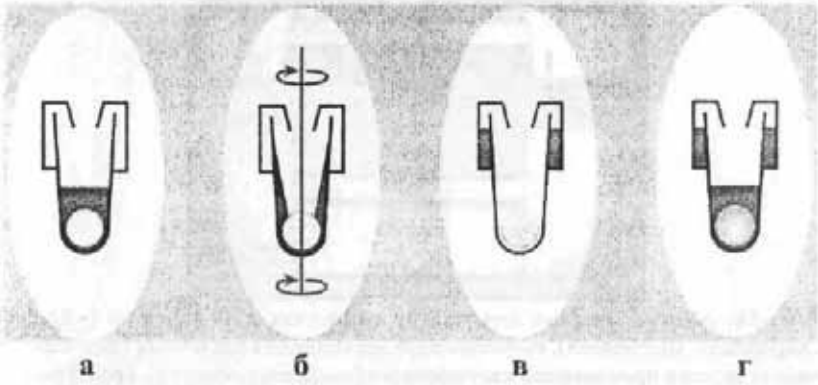


Рис. 34. Схематическое представление процесса иммунохемилюминесцентного определения в автоматическом анализаторе IMMULITE («DPC»). а) Проба и реагент автоматически дозируются в ячейку для теста, содержащую покрытый специфическими антителами шарик, затем ячейка инкубируется при 37°С при постоянном потряхивании. б) После инкубации тест-ячейка подвергается центрифугированию с высокой скоростью вокруг вертикальной оси. Реакционная жидкость полностью отсасывается в специальную камеру, в) В процессе нескольких промываний удаляется весь несвязавшийся материал с поверхности шарика и с внутренней поверхности пробирки, г) Хемилюминесцентный субстрат добавляется в тест-ячейку. Эмитированный свет прочитывается высокочувствительным счетчиком фотонов.

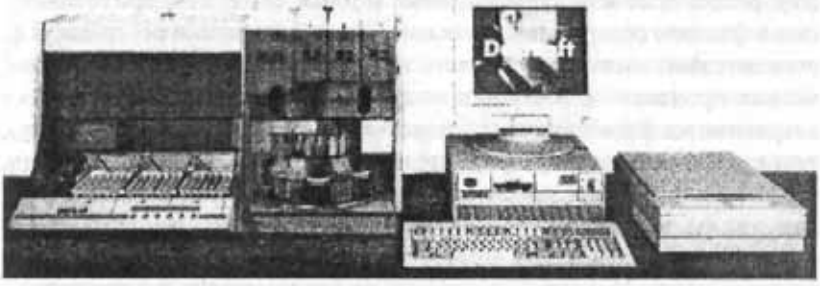


Рис. 35. Автоматизированная система для проведения блот-тестов ДЕСИЛАБ («Sanofi Pasteur»).

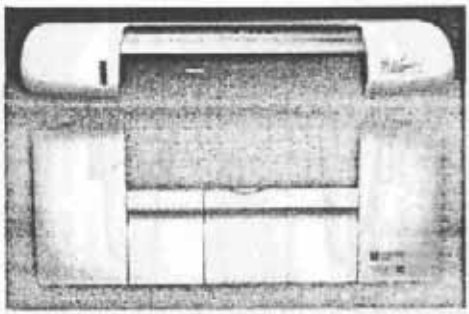


Рис. 36. Автоматический анализатор гемостаза STA Compact («Roche Diagnostics», Швейцария), выполняющий исследования различных гематологических тестов с применением клоттингового (измерение вязкости), хромогенного и иммунохимического (измерение оптической плотности) методов. Производительность до 150 тестов в час, одновременная загрузка до 45 реагентов, возможность программирования до 80 тестов, единый калибратор для рутинных исследований, факторов и маркеров тромбофилии.

рует каждую лунку, подсчитывает число колоний,включая очень мелкие, измеряет площадь, занятую ростом микроорганизмов, и рассчитывает процент этого роста за несколько секунд. Результат заносится в базу данных и распечатывается(рис. 38).

В системе для автоматизации оценки гемокультур Vital (« bioMerieux», Франция)(рис. 39) использован принцип постоянного слежения за величиной флуоресценции питательной среды во флаконах, в которые введены пробы крови пациентов (гомогенная флуоресцентная технология). Специальная поливалентная питательная среда содержит флуоресцентные молекулы, свечение которых снижается при повышении в флаконе содержания углекислого газа, изменении pH среды или окислительно-восстановительного потенциала в результате метаболических процессов в растущих микроорганизмах. Продолжительное встряхивание флаконов способствует росту микроорганизмов и их детекции. Интенсивность флуоресценции воспринимается оптическими волокнами, передающими свет флуоресценции на мультиплексор. Считывание флуоресценции происходит каждые 15 минут на протяжении суток. Скорость снижения флуоресценции оценивается компьютером на основе одного из трех алгоритмов: по наклону кривой флуоресценции - для флаконов, помещенных в прибор сразу после взятия крови, или для анализа медленнорастущих микроорганизмов; по алгоритму

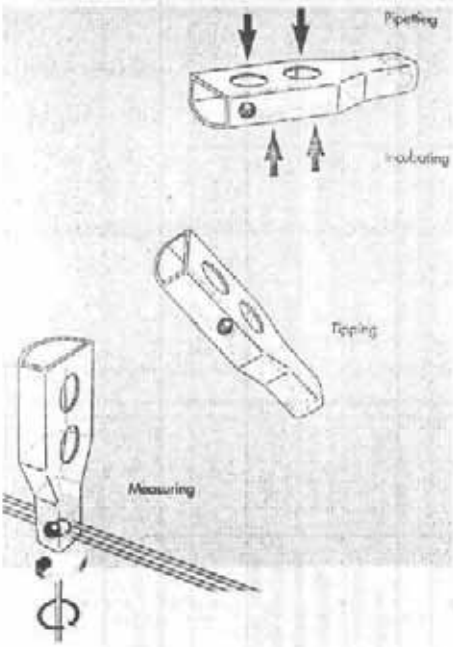


Рис. 37. Схема принципа исследования в автоматическом коагулологическом анализаторе Thrombolyser Combi («Behnk Elektronik»).Сверху вниз: Пипетирование. Инкубация. Перевертывание кюветы. Измерение.

«дельта» - при резком падении флуоресценции вследствие экспоненциального роста микроорганизмов; по алгоритму «порог» - при оценке преинкубированных флаконов.

Один из подходов к автоматизации идентификации микроорганизмов состоит в использовании готовых стрипов, т.е. планшетов из прозрачного пластика с лунками, в которые заранее внесены реагенты для идентификации бактерий по их биохимическим или иммунологическим свойствам .В лунки стрипов вносится порция инокулята, отобранная из культуры бактерии. Стрипы затем подвергаются инкубации в течение 24 часов. Результаты идентификации бактерий подсчитываются автоматически, подвергаются экспертизе для адекватной интерпретации. В системе ATB Expression (« bioMerieux») стрипы для идентификации бактерий содержат 32 теста. В производственной программе этой фирмы стрипы для идентификации энтеробактерий, грам-отрицательных палочек, стафилококков, дрожжевых грибков, для быстрой идентификации энтеробактерий, анаэробов, стрептококков (каждого класса микроорганизмов - по несколько десятков штамммов)(рис. 40).

Таблица 5

Автоанализаторы для коагулогических исследований

Технические характеристики	Фирма, страна, наименование автоанализатора						
	Organon Teknika, Бельгия		Amelung, Германия		Benk Elektronik, Германия, Trombolyzer		
	Coag-A-MATE MTX	MDA-180	AMAX	AMGA	Rack Rotor	Combi	Compact
Конфигурация: –настольная –напольная	+ +		+* +*	+ +	+		
Принцип работы: –дискретный; –центрифужный, –с жесткой программой (серийный, batch); –выбор проб для анализа в случ. последовательности (random access)	+ + +	+ +	+ +	+ +*	+		
Принцип измерения: –механический –оптико-механический –фотометрический	 +	 + + 35 длин волн 405-710 нм	 + +, 405 нм, двухкан. измер. для иммуно-хим. тестов	 + +	+	+,405,546 нм	
Принципы методов: –клоттинговый –с хромоген. субстратами –иммунохимический	+ +	+ + +	+ + +	+ + +	+		
Аналиты и др. исслед. показатели: –протромбин. время (с,%,МНО*) –АЧТВ –тромбиновое время –фибриноген –фибриноген в процессе определения протромбинового времени	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +	+		
–факторы свертывания крови; –физиологич. антикоагулянты –продукты деградации фибрина (Д-димер)	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+		
Срочные анализы: –без прерывания серии; –с прерыванием серии		+	+ +8 поз. для срочн. анализов	+ 6 поз. для срочн анализов	+		
Производительность, исследов./в час: –протромбиновое время; –АЧТВ; –комбинация аналитов	в зависимости от тестов. 320 96	 180 180	>190	400	180 150 45(4аналита)	180 150 45(4аналита)	130 100 25(4аналита)
Идентификация биожидкостей	с клавиатуры или штрих-код	штрих-код	штрих-код	+ с клавиатуры или штрих-код	+ с клавиатуры или штрих-код		
Емкость пробонакопителя: –кол-во мест для биожидкостей пациентов, не включая срочные пробы	48	170	60, поточная загрузка	110, возможность добавления проб	62, в 2 роторах	70, (2 лотка по31 пробирки+ 2-4 поз. для срочных проб)	32 пробирки в лотке+4 позиции для срочных проб
Биожидкости: –плазма	+	+	+	+	+	+	+
Объем биожидкости, мл	различный	0,5					
Возможн. автомат. развед. проб		+	+	+	+		
Реактивы: –открытая система –закрытая система –объем реактивов, мкл –кол-во реактивов в модуле –охлаждение реактивов при хранении в автоанализаторе; –сигнализация об истощении реактивов	+ 5-500 10 + +	+ 30 + +	+ 24 + до 15 °С +	+ 75 –150 16 +, до 15 °С +	+		+ 16+4 флакона для контр. мат. +
Кюветы для реакции и измер-я –тип кювет –кол-во кювет при загрузке в автоанализатор	 32	 480	 450, 5кассет по 90 микрокювет	 500, 5 кассет по 100 кювет	* 240	* 240	* 116

Технические характеристики	Фирма, страна, наименование автоанализатора						
	Organon Teknika, Бельгия		Amelung, Германия		Benk Elektronik, Германия. Trombolyzer		
	Coag-A-MATE MTX	MDA-180	AMAX	AMGA	Rack Rotor	Combi	Compact
Количество измерительных каналов	2	15	4 оптич. +4 механических			4	
Калибровка:							
-калибр. кривая, заданная изготовителем	+	+	+	+		+	
-калибр. кривая по калибр. р-рам			+	+			
-1 калибровочный раствор							
-автомат. разведение калибр. р-ра							
Термостатирование,t,°,C	37°C		37 °C		37°C		
Сист. упр-я результатами:							
-долговр. хранение данных пациентов	+	+	+	+	+, для 10 000 пациентов		
-калибровок	+ кривые для фибриногена и 10 факторов свертывания	+	+	+		+	
-контроля качества;	+		+			+	
-автомат. контроль качества:	+	+	+	+		+	
-в режиме реального времени;	+	+	+	+		+	
-постр. контр. карт Levi -Jennings			+	+			
-правилаBüttner							
-правилаWestgard			+	+			
-сводный бланк результатов			+			+	
-распечатка результатов на внешнем принтере,			+	+		+	
-сообщение о патологич. рез-те	+		+	+		+	
-отчет о результатах			+	+		+	
-интерфейс к ЛИС						+	
Продолжительность работы анализатора без оператора, (walk-away time) мин	20	180	>60**	ок.60	ок 60		
Масса, кг	34	385,6	98, настольная	210	61	50	45

Используемые сокращения:
ПВ - протромбиновое время
АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время

Примечания:
Coag-A-MATE MTX. Дозирование проб производится вручную, возможно подсоединение сэмплера для пипетирования биожидкости как опция. Возможно одновременное определение ПВ и АЧТВ.
MDA-180. Анализатор имеет цветной монитор с сенсорным программированием. Имеются опции для свободного программирования тестов. Возможность использования первичных сосудов с плазмой, закрытых крышками. Селективный анализатор: до 12 одновременно выполняемых методов.
AMAX. Могут быть использованы первичные пробирки различных типов с определением уровня плазмы в них.
* 2 версии.
** Время выполнения анализов в 5 кассетах, каждая с 90 микрокюветами.
AMGA. *Селективный многоканальный анализатор. Возможно использовать пробирки разных типов.
Trombolyzer. * Плазма и реактивы пипетируются при горизонтальном расположении кюветы. В измерительном блоке кювета поворачивается на 90°С в вертикальное положение. Стальной шарик, плазма и реактив двигаются ко дну кюветы; вращающийся магнит вызывает вращение шарика в стационарно расположенной кювете. После образования нитей фибрина, шарик останавливается, одновременно образуется надежный сигнал детекции, регистрируется время свертывания в клоттинговых тестах, а в методах с хромогенными субстратами и иммунохимических проводятся фотометрические измерения. В анализаторе Rack Rotor ротор с первичными пробирками вставляется как штатив. 2 ротора гарантируют поточную рутинную работу. Переключение идентификации и пипетирования проб с одного ротора на другой автоматическое после получения результатов для биожидкостей в первом роторе.

Технические характеристики	Наименование автоанализатора, фирма, страна						
	STA Compact Diagnostica Stago, Roche, Швейцария	Coasys110 Boehringer Mannheim, Behk Elektronik, Германия	ACL 100-7000 Instrumentation Laboratory, США	Electra, Medical Laboratory Automation, Hemoliance, США		Sysmex CA-500 Dade Diagnostika GmbH, Behring Diagnostia, Германия	Behring Coagulation System-BCS, Dade Behring INC, США, Германия
				1400C	1600C		
Конфигурация: -настольная -напольная	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -
Принцип работы: -дискретный; -центрифужный, -с жесткой программой (серийный, batch) -выбор проб для анализа в случ. последовательности (random access)	+ - +	+ - -	- + -	+ - +	+ - +	+ - +	+ + +
Принцип измерения: -механический -оптико-механический -фотометрический -нефелометрический	+(изм. вязкости) - + 405, 540 нм	- + -	- - +* +	- - + +	- - + +	- + +, 405нм +, фотоэлектрич. 660 нм	- - + 340,405,570нм -
Принципы методов: -клоттинговый -с хромоген. субстратами -иммунохимический	+ + +	+ - -	- + +	+ + -	+ + -	+ + -	+ + +
Аналиты и др. исслед. показатели: -протромбин. время (с,%,МНО*) -АЧТВ -тромбиновое время -фибриноген	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +

-фибриноген в процессе определения протромбинового времени -факторы свертывания крови; -физиологич. антикоагулянты -продукты деградации фибрина (Д-димер)	+ + + +	- + + +	+ + + +	+ + + +	- + + +	+ + + +	+ + + +
Срочные анализы: -без прерывания серии -с прерыванием серии	+ - +	+ + -	+ - -	+ + -	- - -	+ - -	+ + -
Производительность, исследов./час: -протромбиновое время; -АЧТВ; -комбинация аналитов	до150 - - 30-50	- 130 100 25 (4 аналита)	- 110/175** 80/115**	99-200 200 136	87-227 227 136	> 50	60-350 350 280 165 (2аналита), 120(3 ан), 85 (4ан), 60(5 ан)
Идентификация биожидкостей	с клавиатуры или штрих-код	+	+ с клавиатуры или штрих-код	+,с клавиатуры, штрих-код	+,с клавиатуры, штрих-код*	+,с сенсорного дисплея	штрих-код
Емкость пробонакопителя: -кол-во мест для биожидкостей пациентов, не включая срочные пробы	96 (+ срочные пробы)	32(+4 для срочных проб)	-	35**	100**	-	110* в штативах
Биожидкости: -плазма -кровь	+ -	+ -	+ -	+ -	-	+ -	+ -
Объем биожидкости, мл	2,5 –5,0	-	40-100	-	-	10-50	-
Объем пробы, мкл	-	-	40-75	25-100	-	-	-
Возможн. автомат. развед. проб	+	+	+	-	-	+	+
Реактивы: -открытая система -закрытая система -объем реактивов, мкл -кол-во реактивов в модуле	+ - - 45	+ - - 16+4 для флаконов с контр. плазмами)	- + - -	+ - - -	-	+ - - 10 в сменном штативе	+ - - 30

Технические характеристики	Наименование автоанализатора, фирма, страна						
	STA Compact Diagnostica Stago, Roche, Швейцария	Coasys110 Boehringer Mannheim, Behk Elektronik, Германия	ACL 100-7000 Instrumentation Laboratory, США	Electra, Medical Laboratory Automation, Hemoliance, США		Sysmex CA-500 Dade Diagnostika GmbH, Behring Diagnostia, Германия	Behring Coagulation System-BCS, Dade Behring INC, США, Германия
				1400C	1600C		
–охлаждение реактивов при хранении в автоанализаторе;	+,15°C-20°C**	+,16°C-18°C	+12°C-15°C	+			+
–сигнализация об истощении реактивов;	+		+	+			+
–кол-во реактивов на 1 анализ	до 2-х		до 3-х				
Кюветы для реакции и измер-я –тип кювет				+	+		кюветы –секторы ротора, 20 роторов по 20 кювет при одновременной загрузке
–кол-во кювет при загрузке в автоанализатор	1000 в ротворе с метал. шариком	116		140,280, постоянная загрузка кювет	450	пробирки 60	
Количество измерительных каналов	4	4	2: нефелометр. фотометрич.			5	
Калибровка:							
–калибр. кривая, заданная изготовителем	+	+	+***	+		+	+**
–калибр. кривая по калибр. р-рам	+		+			+	+**
–1 калибровочный раствор	*						
–автомат. разведение калибр. р-ра	+			+		+	+
Термостатирование,°C	37°C±0,5°C	37°C	37°C	37°C		37°C	37°C
Возможность подключения линии для транспортировки проб	+	+					?
Свет. упр-я результатами:							
–долговременное хранение данных пациентов	+,600 для пациентов по 12 рез-ов (7200)	+, для 10 000 пациентов	+	+, 100 000 результатов		+,1500 рез-ов (300 проб по 5 парам.)*	+
–калибровок	+	+	+	+		+	+
–контроля качества;						+	+
Автомат. контроль качества:	+	+	+	+***		-*	+
–в режиме реального времени;	+		+	+		+	+
–постр. контр. карт Levi –Jennings	+			+		-	-

–правилаBüttner				+		+	+
–правилаWest-gard	+						
–сост-е сводного бланка рез-ов	+	+	+	+		+	+
–распечатка результатов на внешнем принтере,	+	+	+			+	+
–сообщение о патологич. рез-те	+	+	+	+		+	+
–отчет о результатах	+	+	+	+		+	+
–интерфейс к ЛИС		+	+	+		+	+
Продолжительность работы анализатора без оператора, (walk-away time) мин	ок .180	ок. 60					
Масса, кг	140	45	51,7	89,8	112	45	

Используемые сокращения:

ПВ - протромбиновое время

АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время

Примечания:

STA Compact. *Калибровочные кривые линейного и нелинейного характера. Имеется единый калибратор для многих аналитов, факторов, маркеров тромбофилии. Стабильность калибровок до 6 недель.

**Стабильность реактивов от 48 до 360 часов в зависимости от реактива. Пользователь может запрограммировать до 80 тестов.

ACL 100-7000. *Отсутствует в ACL100 и ACL 1000, в остальных анализаторах этого типа используется 2 принципа измерения – нефелометрический и фотометрический. В анализаторах ACL2000, 3000, 3000plus, 6000 могут быть использованы в качестве первичных стандартные лабораторные пробирки. Реакция проводится в секторах ротора, каждый из которых заканчивается измерительной кюветой.

** ПВ или фибриноген; (цифра после /).

***Калибровочная кривая рассчитывается для ACL3000 по 1000 точкам.

Electra. * К автоанализатору Electra 1600C имеются опции: станция считывания штрих-кода и ручной сканнер.

** Может быть использовано до 8 типов различных первичных пробирок.

*** 70 отдельных файлов (500 данных на файл), хранение статистических данных в течение 18 месяцев.

Sysmex CA-500. * Кривые реакции последних 600 анализов.

Behring Coagulation System-BCS. *Могут быть использованы первичные пробирки любых типоразмеров.

**Автокалибровка: 1. Одновременно может быть выполнено 20 разных тестов. В режиме случайного доступа возможно проведение исследований для 60 тестов одновременно. 2. Запуск BCS в работу осуществляется по системе автостарта путем закрытия крышки BCS после загрузки анализатора.

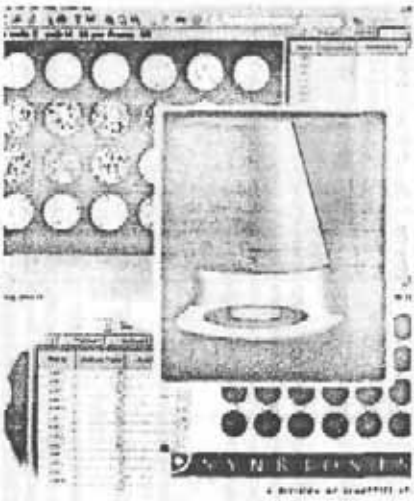


Рис. 38. Автоматический счетчик колоний микроорганизмов ProtoCOL XR («Synbosis»,Англия).

Рис. 39. Автоматизированные системы для оценки гемокультур VITAL и miniVITAL («bioMerieux», Франция).

Рис. 40. Система для автоматической идентификации и определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам ATB Expression («bioMerieux», Франция).

Та же фирма предложила автоматизированный тест HIV DUO для обнаружения начальной стадии инфицирования ВИЧ, основанный на комбинированной детекции антигена p24 и антител анти-ВИЧ1 и анти-ВИЧ2 с автоматизированным подсчетом результатов на приборах VIDAS/miniVIDAS (рис. 41).

Процесс определения чувствительности бактерий к антибиотикам автоматизирован на основе того же подхода, только в лунки стрипов (16 или 32) вносят различные дегидратированные антибиотики. Инкубация длится в течение 18-24 часов (быстрая инкубация требует только 4 часов).

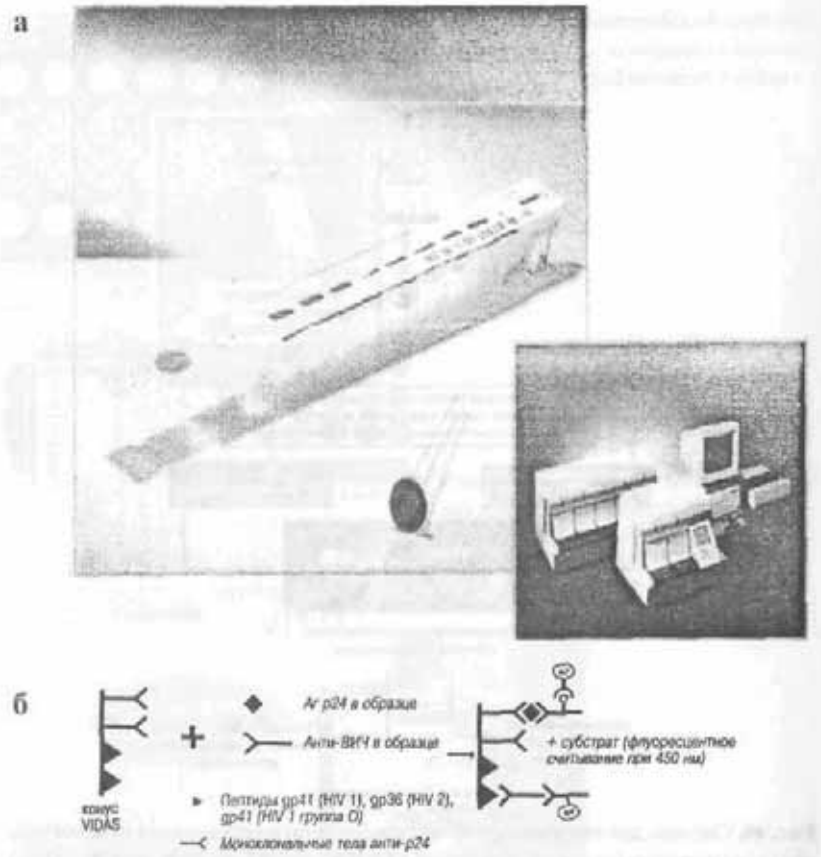


Рис. 41. Автоматизированный тест для обнаружения ВИЧ-инфицирования VIDAS HIV DUO(«bioMerieux», Франция). а) Вид прибора VIDAS. б) Принцип теста.

Автоматические бактериологические анализаторы WalkAway -40, WalkAway-96 и полуавтоматический AutoScan-4, представляемые в России дистрибьютором EcoMedPoll, предназначены для идентификации микроорганизмов (от 2 часов) и определения их чувствительности к широкому кругу антибиотиков.

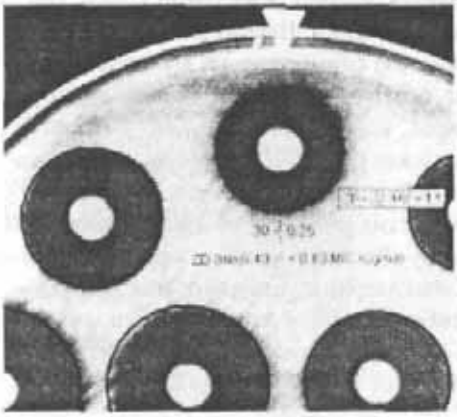
BIOMIC Video System («Giles Scientific Inc»., США), состоящая из видеоридера и программного обеспечения (рис. 42 а), совместимого с любым компьютером Pentium, оценивает автоматически чувствительность

микроорганизмов к антибиотикам и рассчитывает минимальную ингибиторную концентрацию (MIC) на основе цифрового анализа изображений чашек Петри с нанесенными на них стандартными дисками с антибиотиками и точного учета градиента агара вокруг дисков с антибиотиками в течение трех секунд. (рис. 42 б).

Автоматизация коснулась и отдельных видов исследований, которые могут требоваться в больших сериях. Так, фирма «Olympus» предлагает автоматизированные устройства для электрофореза белков на пленках HITE FJ (для небольших лабораторий), HITE 320 (с производительностью до 57 проб в час) и HITE 630 (с производительностью до 155 проб в час) для лабораторий различной мощности (рис. 43).

В центрах переливания крови может быть эффективно использована автоматизированная система определения групп крови PK 7200 (для ма-

а



б

Рис. 42. Автоматизированная система для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и расчета минимальной ингибиторной концентрации BIOMIC Video System («Giles Scientific Inc.», США), а) Вид системы б) Деталь изображения чашки Петри с результатами расчета MIC.

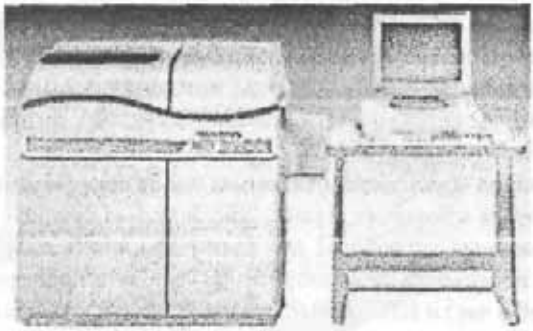


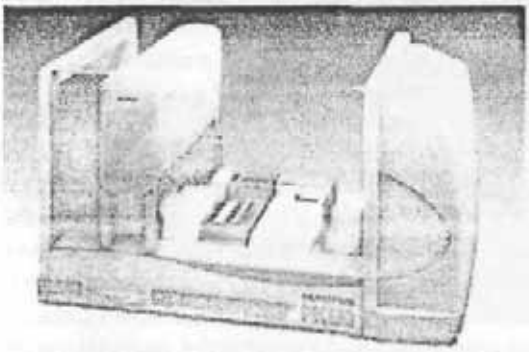
Рис. 43. Автоматизированная система для проведения электрофоретического разделения белков HITE 630 («Olympus»).

лых лабораторий - РК 80)(рис. 44 а) фирмы «Olympus», основанная на оригинальной технологии терраспых микропланшет. Лунки микропланшет выполнены в виде концентрических уступов. При отрицательной реакции эритроциты соскальзывают в центр лунки, при положительной реакции - агглютинировавшие эритроциты задерживаются на уступах (рис. 44 б). Интенсивность света автоматически измеряется в цифровой форме в трех зонах с диаметрами 1,5 мм, 2,5 мм и в лунке в целом. Производится 5 различных типов микропланшет с глубиной уступов от 5 до 16 мкм. Наличие различных комбинаций каналов в микропланшетах делает возможным на этих приборах не только определять группы крови и резус-фактор, но и производить тесты для диагностики инфекционных заболеваний, например, сифилиса.

Хотя вязкость крови исследуется гораздо реже групп крови, тем не менее и этот тест подвергся автоматизации. Benson plasma viscosimeter («Benson Viscosimeters Ltd.», Англия) автоматически выполняет исследования до 60 проб плазмы в час, обеспечивает автоматическую загрузку в кюветы из первичных пробирок, идентификацию проб, располагает компьютерным контроллером и может работать как в формате отдельного прибора, так и в цепи других лабораторных анализаторов (рис. 45).

Возрастающий интерес клинических лабораторий к молекулярно-биологическим методам побудил фирму «Roche Diagnostics» к разработке автоматического ПЦР-анализатора Cobas Amplicor, который производит автоматизированную амплификацию, гибридизацию и детекцию с использованием тест- систем Cobas Amplicor. Хотя пробы готовят вручную, использование прибора позволяет осуществлять от 48 до 144 тестов в сутки (рис.46).

а



б

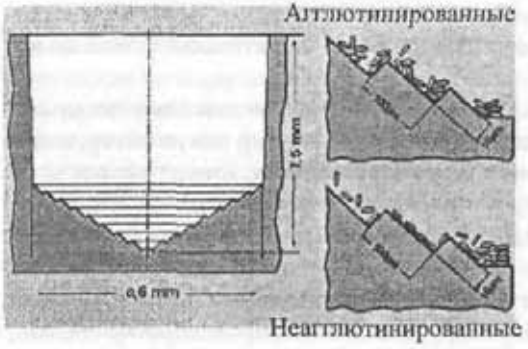


Рис. 44. Автоматизированная система определения групп крови («Olympus»). а) Настольный вариант системы РКЗО. б) Принцип определения групп крови с помощью «террасной» технологии: поперечный разрез лунки микропланшета, осаждение агглютинировавших эритроцитов на верхних уступах лунки, скатывание неагглютинировавших эритроцитов на дно лунки.

Рис. 45. Автоматизированное устройство для определения вязкости плазмы крови Benson plasma viscosimeter.

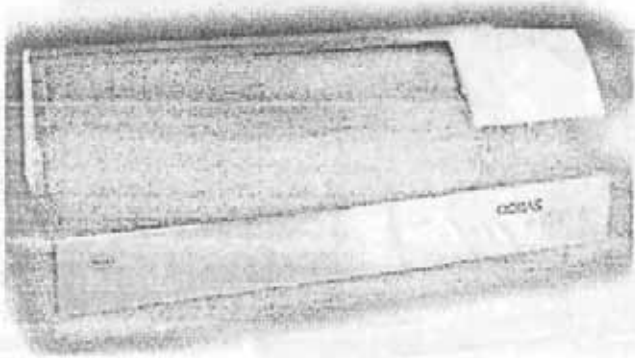


Рис. 46. Автоматический ПЦР-анализатор COBAS Amplicor («Roche Diagnostics»).

Таким образом, автоматизированные аналитические системы могут быть:

а/ полуавтоматическими, с раздельными блоками для отдельных этапов аналитических процедур (дозатор, диспенсер или дилютор, встряхиватель, центрифуга, термостат, реакторный блок, измерительное устройство, промывающее устройство, компьютер, принтер)

б/ полностью автоматизированными, сочетающими обработку пробы, анализ, расчет и выдачу результата в одном моноблоке (варианты: специализированные на одном методе исследования, например, анализатор глюкозы; профилизированные на одном виде исследований, например, биохимический автоанализатор)

в/ автоматизированными микроскопами, в том числе оснащенными устройствами для детекции, регистрации, анализа и передачи изображений на расстоянии

г/ автоматическими многоцелевыми анализаторами, сочетающими в одном моноблоке или в комплексе состыкованных в одну систему модулей выполнение параллельно нескольких видов исследований (биохимических, иммунохимических, коагулологических и т. п.)

Консолидация аналитики и интеграция лабораторной информации

Стремление к созданию **многоцелевых автоматических анализаторов**, имеющих в своей структуре аналитические линии для различных видов исследований, основано как на реальных технических возможностях такого объединения, так и на потребности получения из одной порции биоматериала возможно более полной и разносторонней информа-

ции о состоянии внутренней среды организма пациента. Сопоставление результатов обычных биохимических исследований с данными иммунохимических, гематологических, коагулологических исследований не просто расширяет рамки получаемой врачом информации, но и может выявить новые аспекты в состоянии пациента. Техническая реальность - возможность в одном приборе или в комплексе взаимосвязанных приборов одновременно исследовать многими методами разнообразные аналиты биоматериалов пациента - и диагностическая выгода - многофакторный анализ состояния внутренней среды пациента - послужили отправным пунктом для возникновения и практической реализации идей консолидации и интеграции в клинической лабораторной аналитике.

Консолидация, представляющая собой объединение в одном консолидированном приборе различных аналитических способов, проявляется в настоящее время даже в приборах, относящихся к одной лабораторной дисциплине. Выше уже подробно рассматривались многообразные аналитические подходы используемые в современных гематологических проточных автоматических цитофлюорометрах, где сопоставление результатов кондуктометрии, измерения флюоресценции и рассеянного клетками света и методов специфического связывания позволяет многосторонне оценить практически весь клеточный спектр крови. Автоматические биохимические анализаторы Hitachi 902, 912, 917, используя 3 принципа измерения: фотометрию, турбодиметрию, потенциометрию, способны исследовать содержание в сыворотке, плазме, спинномозговой жидкости, моче субстратов, ферментов, специфических белков, ряда гормонов, электролитов, лекарств и наркотиков (рис. 47). Дальнейшее развитие этого направления реализовано в универсальном анализаторе для клинической химии Cobas Integra («Roche Diagnostics», Швейцария), где используются 4 принципа измерения: наряду с указанными выше тремя оценивается еще и поляризация флюоресценции (Рис. 48).

В автоматических анализаторах для иммунохимических исследований также возможно сочетание нескольких методов исследования, что значительно расширяет круг аналитов, исследование которых можно выполнять на таких приборах. Так, в системе AXSYM («Abbott Diagnostic») благодаря сочетанию трех методов исследования: поляризации флюоресценции (FPIA), захвата ионов (ICIA) и иммуноферментного анализа на микрочастицах (MEIA) - могут определяться концентрации ряда вирусных антигенов и антител, маркеров опухолей, гормонов щитовидной и поджелудочной желез, гипофиза и стероидных гормонов,

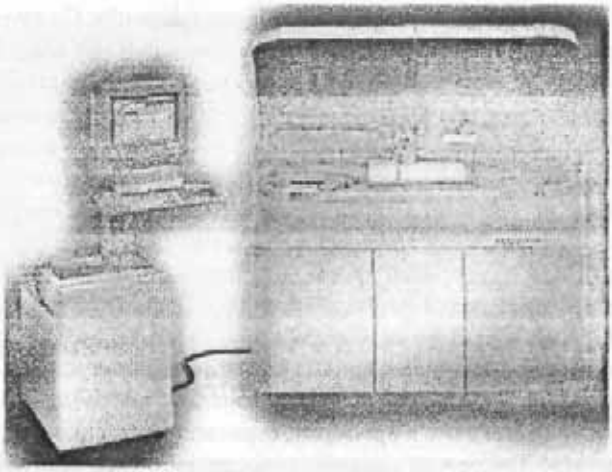


Рис. 47. Консолидированный автоматический анализатор Hitachi 917 («Roche Diagnostics, Швейцария). Принципы измерения: фотометрия, турбодиметрия, потенциометрия. Производительность до 800 фотометрических тестов в час (1500 с электролитным блоком), одновременная загрузка до 110 проб. Калибровка линейная и нелинейная, автоматическое разведение для многоточечной калибровки. Источник света - галогеновая лампа, диапазон длин волн 340-800 нм, измерение по 12 длинам волн, бихроматическое измерение. Срок службы постоянных кювет 4-8 недель.

антител к паразитарным организмам, сердечных маркеров, витаминов, метаболитов, лекарств, наркотических веществ. Технологическая особенность этого прибора состоит в том, что для методов ICIA и MEIA в качестве матрикса в реакционной емкости используется сеть из стекловолокна. В методе ICIA образец инкубируется с реактивом захвата ионов, которое представляет собой полианионное соединение, обладающее аффинитетом к аналиту. Проба переносится на поверхность стекловолоконного матрикса, предварительно обработанного четвертичным аммонием. Разделение осуществляется благодаря взаимодействию ионов: положительно заряженного матрикса и отрицательно заряженного реактива захвата. Концентрация аналита измеряется по величине флюоресцентного сигнала, вызванного наличием флюорохрома метиламбеллиферона. В методе MEIA микрочастицы, несущие на себе комплекс антиген-антитело, также взаимодействуют со стекловолоконным матриксом, к которому они обладают сродством. На поверхности матрикса остаются

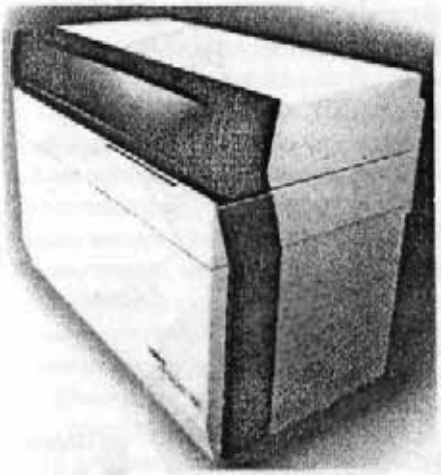


Рис. 48. Универсальный консолидированный анализатор для клинической химии Cobas Integra («Roche Diagnostics, Швейцария). Принципы измерения: фотометрия, турбодиметрия, поляризация флюоресценции, потенциометрия. Производительность 600 тестов в час, 800 тестов с электролитами. Исследуемый материал : сыворотка, плазма, гемолизат, спинномозговая жидкость, моча. Объем пробы: 2-10 мкл, 97 мкл для определения с помощью ион-селективных электродов (40 мкл для мочи). Одновременная загрузка до 150 проб. Калибровка линейная и нелинейная с автоматическим разведением для многоточечной калибровки. Оптическая система :источник света галогеновая лампа, монохроматор (дифракционная решетка), 340-660 нм, спектрофотометр, измерение по 12 длинам волн, бихроматическое измерение.

лишь конъгированные с щелочной фосфатазой частицы с аналитом, концентрация которого измеряется также по величине флюоресцентного сигнала, вызванного метиламбеллиферон фосфатом. Измерение флюоресценции осуществляется кинетически. Схема устройства прибора приведена на рис.49.

В мультимаркерном счетчике VICTOR² («Wallac», Финляндия), заложена возможность определения в одной и той же лунке до 10 различных неизотопных меток, используя свыше 10 различных способов измерения: интенсивности флюоресценции(сверху и снизу), флюоресценции с разрешением во времени, двух-оконной флюоресценции с разрешением во времени, люминесценции, в том числе вспышек и двойного типа, фотометрии, абсорбции света вспышек, специальные измерения двойных меток, двойное возбуждение и эмиссия флюоресценции, сканнирование, быстрые и медленные кинетические измерения. При работе с прибором могут быть применены все известные типы микропланшет от 6- до 864-луночных, а также чашки Петри, планшеты Терасаки, пленки, слайды и пр. Может быть вмонтирована 20-планшетная загрузочная стойка для автоматической загрузки прибора и обеспечения непрерывного подсчета

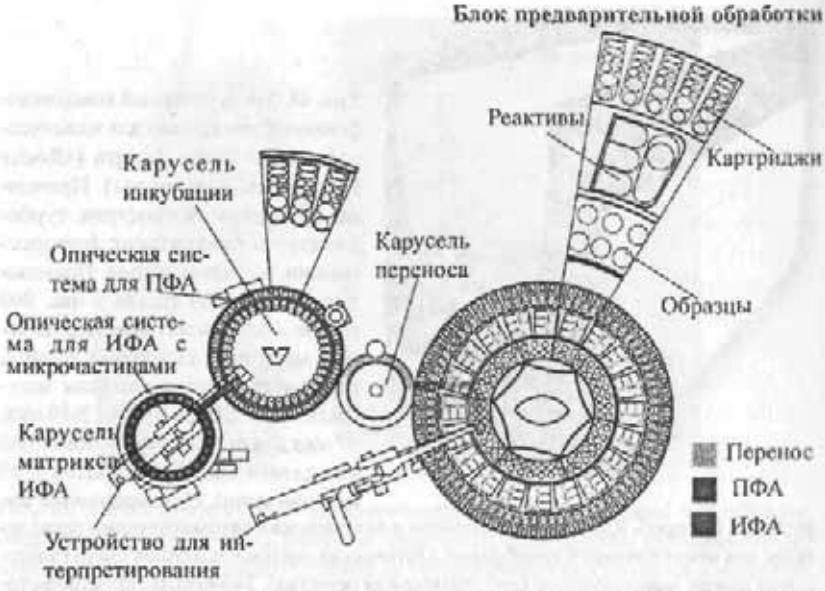


Рис. 49. Автоматический иммунологический анализатор AXSYM (« Abbott Diagnostic») Схема устойства основных блоков прибора. Справа сверху вниз: Блок предварительной обработки. 1. Реакционные емкости. 2. Картриджи с реагентами. 3. Пробирки с образцами. 4. Карусель переноса проб. Слева сверху вниз: 5. Карусель инкубации. 6. Оптическая система для поляризационно-флюоресцентного анализа. 7. Оптическая система для иммуноферментного анализа с микрочастицами. 8. Карусель для емкостей с матриксом иммуноферментного анализа. 9. Роботизированные устройства для пипетирования.

результатов. Прибор может быть сочленен с роботизированной системой пробоподготовки.

В последнее время был предложен также термин *гибкая консолидация*, означающий такую конструкцию автоматического анализатора, которая позволяет комбинировать по желанию пользователя различные заложенные в приборе аналитические возможности, а также добавлять в прибор по специальному заказу некоторые дополнительные блоки.

Создание таких многоцелевых приборов представляет значительные технические трудности, преодоление которых связано с немалыми затратами, что, естественно, отражается в высокой стоимости этих приборов, и поэтому их использование должно быть экономически оправдано

и рационально организовано (крупные стационары, медицинские центры, региональные централизованные лаборатории).

Интеграция является еще более высокой ступенью технико-экономической организации лабораторной работы, поскольку воплощает на современном этапе максимальное воссоединение в едином лабораторном организме всех видов лабораторных исследований на основе комплексной автоматизации всех этапов их осуществления, начиная от стадии идентификации взятых у пациентов проб биоматериалов, включая все стадии пробоподготовки, внутрилабораторной транспортировки проб, выполнения разнообразных анализов, и завершая оформлением и передачей по назначению кумулятивного отчета о результатах проведенных исследований, при необходимости - с их предварительной интерпретацией.

Конструирование такой полностью **автоматизированной лаборатории** в значительной мере повторяет принципы конструирования отдельного автоматического анализатора, т.е. должны быть автоматизированы и связаны друг с другом определенные функциональные зоны: зона приема образцов, пункт считывания штрих-кодов, автоматическая центрифуга, зона контроля пригодности сывороток, устройство для откупоривания пробирок, установка для распределения (раскапывания) материала образцов по пробам для отдельных видов исследований, принтер штрих-кодов для вторичных пробирок с раздозированными пробами, зона анализаторов, центральный процессор лаборатории для объединения результатов, полученных на различных анализаторах.

Комплексная роботизация и автоматизация целой клинической лаборатории стала теперь реальностью, воплощенной в конкретных устройствах и представленной во многих крупных медицинских центрах Японии, Соединенных Штатов Америки, ряда европейских стран.

Формирование автоматизированного лабораторного комплекса может быть осуществлено различными путями. Один из подходов, по существу продолжающий линию гибкой консолидации, базируется на *модульном принципе* конструирования многопрофильных автоматизированных систем. В автоматической системе Modular («Roche Diagnostics», Швейцария), состоящей из 5 аналитических модулей, которые могут быть по желанию пользователя состыкованы в виде 30 различных комбинаций, заложена возможность исследования до 160 различных аналитов (рис. 50). По модульному принципу построена и система ARCHITECT («Abbott»).

Другой подход предусматривает *тотальную автоматизацию лаборатории*, в которой все этапы пробоподготовки и все аналитические

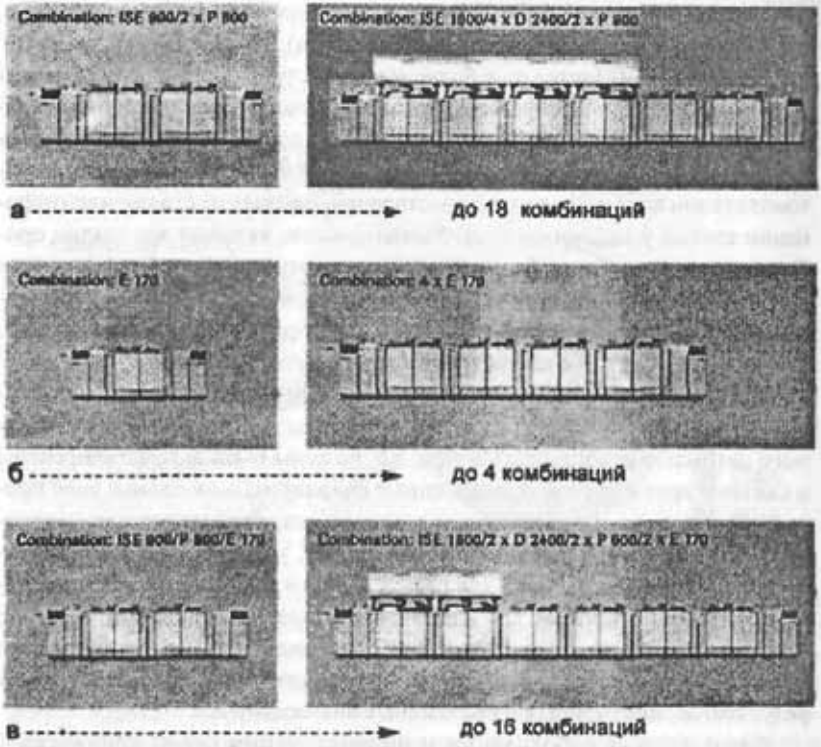


Рис. 50. Автоматическая аналитическая система Modular Analytics («Roche Diagnostics, Швейцария) состоит из 5 аналитических модулей, гибко сочетаемых более чем в 30 различных комбинациях с возможностью определения до 160 аналитов и производительностью до 6000-10000 тестов в час. а) Modular Analytics *с фотометрическими модулями для клинико-химических тестов, опре*деления индивидуальных белков, лекарственного мониторинга и других тестов (до 18 комбинаций модулей, производительность от 800 до 10000 тестов в час , возможность определения свыше 90 аналитов). б) Modular Analytics с модулями «Элексис» для иммунологических тестов (до 4 комбинаций модулей, возможность определения свыше 30 аналитов, производительность от 170 до 680 тестов в час. в) Modular Analytics с фотометрическими модулями и модулями «Элексис» для клинико-химических и иммунологических исследований (до 16 комбинаций модулей, возможность определения свыше 130 аналитов, производительность от 800 до более чем 6000 тестов в час).

процессы выполняются автоматическими устройствами, связанными в единую лабораторную сверхсистему. .При этом особое внимание обращается на автоматизацию процессов пробоподготовки, включая сортировку, центрифугирование, откупоривание закрытых пробирок, отбор проб и их маркировка, поскольку подсчитано, что при его выполнении вручную лабораторный персонал тратит до 65% рабочего времени (на транспорт проб - 2%, на подготовку проб к хранению - 10%). Технически проблемы автоматизации всех этапов пробоподготовки : дозирования проб и реагентов, маркировки проб биоматериала, окрашивания мазков биоматериалов и т.п. - решены. Следует иметь в виду, что в автоматизированной лаборатории, выполняющей широкий круг лабораторных тестов, разнообразие требований к пробоподготовке для различных видов исследований создает дополнительные технические трудности. Тем не менее, предложены несколько вариантов решения и этой проблемы на основе создания гибкого программного обеспечения для компьютеров, управляющих пробоподготовительными устройствами. Использование штрихового или электронного кодирования и считывания кодов образцов биоматериалов и проб, механической транспортировки контейнеров с пробами от прибора к прибору позволило связать воедино все процессы пробоподготовки .Наиболее распространенным является способ размещения вдоль конвейерной линии устройств пробоподготовки либо в виде отдельных островковых устройств, последовательно выполняющих необходимые процедуры, либо в виде одного модуля, выполняющего весь комплекс этих процедур (например, типа Genesis - см. выше) .

Следующей проблемой является обеспечение автоматизированного транспорта подготовленных проб к автоматическим анализаторам, осуществляющим различные предписанные в отношении биоматериала пациента исследования. Предлагалось осуществлять транспортировку проб с помощью специальных роботов. Однако наиболее удобным оказалось простое продление конвейерной линии от зоны пробоподготовки до автоанализаторов, которые выполняют необходимые исследования по мере продвижения пробы по конвейеру (рис. 51 а и б). Разновидность этого способа состоит в разделении потока проб после их автоматизированной подготовки на несколько конвейерных линий, соответственно различным аналитическим процессам. Так, в одной из первых полностью автоматизированных лабораторий - в медицинском центре Университета г. Осака (Япония) (рис. 52) - конвейерная линия общей длиной 141 м имеет ответ-

Рис. 51. а) Общий вид автоматизированной лаборатории с одной конвейерной линией. б) Схема комплексной автоматизации клинической лаборатории («Labsystems», «Clids», «Konelab»). 1. Ввод проб на конвейер. 2. Центрифугирование. 3. Откупоривание пробирок. 4. Сортировка проб. 5. Разлив аликвот для отдельных видов исследований. 6. Маркировка пробирок. 7. Биохимический анализатор. 8. Гематологический анализатор. 9. Иммунологический анализатор. 10. Коагулологический анализатор. 11. Сортировка пробирок. 12. Закупоривание пробирок. 13. Сохранение проб. 14. Выход пробирок с конвейера.

вления к рабочим станциям для выполнения клинико-химических, иммунологических и гематологических исследований.

Понятно, что функционирование большой интегрированной лаборатории невозможно без надежного и гибкого управления как самим при-

Рис. 52. Общий вид помещения и оборудования полностью автоматизированной клинической лаборатории больницы Университета г. Осака (Япония).

борным парком, так и потоками информации, поступающими от работающих приборов. Реализация этого требования находит свое выражение в создании лабораторных управляющих или информационных систем, которые разрабатываются на коммерческой основе специализированными организациями, или формируются крупными производителями лабораторного оборудования для лабораторий, оснащенных приборами этих фирм. О лабораторных информационных системах, разрабатываемых для управления разнообразным оборудованием - см. ниже в разделе о компьютеризации в клинической лаборатории. Здесь же приведем пример лабораторной управляющей системы для лаборатории, полностью оснащенной приборами фирмы «Roche Diagnostics»(рис. 53).

Идея интеграции лабораторий находит свое выражение и в объединении информации, получаемой относительно одного и того же пациента в территориально разделенных лабораторных организмах (лаборатория приемного отделения, лаборатория отделения реанимации и интенсивной терапии, центральная лаборатория больницы). При этом центр тяжести переносится на сопоставимость методических принципов и результатов исследований, на способы передачи и обобщенной обработки информации, полученной из разных источников.

В международных лабораторных кругах обсуждается и концепция *систематизации (интеграции систем),* которая состоит в разработке, согласовании и реализации единых принципов взаимодействия всех отдельных систем, участвующих в процессе обследования пациента. Внутри лаборатории - это пробоподготовительные роботизированные устройства,

Рис. 53. Схема управляющей лабораторной системы LSM («Roche Diagnostics»).

анализаторы и информационные технологии. Важным аспектом является преодоление некоторого разобщения между лабораторными субдисциплинами и формирование обобщенного представления о состоянии пациента на основе сопоставления результатов отдельных видов исследований, характеризующих различные стороны деятельности организма.. Однако, для реализации в полной мере всех возможных выгод систематизация должна охватывать и внелабораторный сектор: рациональную подготовку пациента к проведению лабораторного теста, правильный сбор образца биоматериала, полноценное информирование лабораторных специалистов о клинических проблемах, совместное обсуждение результатов анализов лабораторными специалистами и клиницистами.

Предложено несколько вариантов технических решений систематизации, охватывающей долабораторный и лабораторный этапы. Один из

этих вариантов, представленный системой CLIDS (CLIDS Automation, «Thermo- Labsystems», Финляндия) рассмотрен в разделе «Элементы лабораторной работы». Достоинство этой системы в обеспеченном взаимосвязанной системой электронных устройств: ручным терминалом медицинской сестры с контактной и беспроводной передачей информации, электронным носителем информации о пациенте и назначенных ему исследованиях - микрочипом- в держателе пробирки с образцом биоматериала, считывателями кодов и управляющими микропроцессорами в лабораторных приборах, общим лабораторным сервером, больничным компьютером - едином информационном потоке от клинического персонала через все этапы обработки и анализа проб, лабораторную информационную систему, больничную информационную систему к заказчику и «потребителю» лабораторной информации о пациенте - лечащему врачу. Другой вариант технического обеспечения систематизации в масштабе медицинского учреждения представлен интегрированным модульным комплексом устройств и приспособлений, разработанным « Science Park Raf» (Италия).в сотрудничестве с «Becton Dickinson», «Roche Diagnostics» и рядом других фирм, включающим «Patient Safety Enabler» (устройство, содержащее все необходимую информацию о пациенте, закрепляемое на его руке)(рис. 54 а); вакуумные пробирки для сбора образцов биоматериалов со штрих-кодами, несущими необходимую информацию о пациенте и требуемых анализах (рис. 54 б); «Smart Cart» - эргономичное передвижное приспособление, объединяющее одномерные и двумерные ридеры, принтер маркировки пробирок (рис. 54 в), переносной компьютер с многофункциональным программным обеспечением Mobilab 2,0 (рис. 54 г), способный управлять автоматическими устройствами, интегрированными в «Smart Cart» и обеспечить правильное взятие и маркировку проб, а также двустороннюю связь с лабораторной и больничной информационными системами.

Технологические и клинические выгоды консолидации, интеграции и систематизации кажутся очевидными, однако, экономические и организационные условия перестройки работы лабораторий на этих принципах требуют особенно тщательной проработки. Автоматизация с применением консолидированных автоматических анализаторов рассматривается как первая стадия этого процесса. Практически она может быть легко осуществлена за счет простого включения этих приборов в повседневную работу лаборатории с нагрузкой от 400 и более исследований в день. Правда, при этом приходится перестраиваться в психологическом (а может

Рис. 54. Комплекс оборудования для систематизации долабораторной и лабораторной зон обследования пациента («Science Park Raf», Италия), а) «Patient Safety Enabler» -индивидуальный браслет с закодированной информацией о пациенте, б) Вакуумные пробирки Vacutainer для взятия образцов биоматериалов с закодированной информацией о пациенте и перечне назначенных ему исследований, серийном номере продукции и сроке ее годности, в) Smart Cart - эргономичное передвижное устройство, интегрирующее комплекс приспособлений для взятия образцов биоматериала, печатания маркировочных наклеек на пробирки с данными о пациенте и назначенных ему исследованиях, одно- и двумерные ридеры штрих кода и др. г)мобильный персональный компьютер со специализированным программным обеспечением и двусторонней связью с лабораторной и больничной информационными системами.

быть - и в образовательном) отношении некоторым лабораторным специалистам, так как существующее разделение на лабораторные субдисциплины и специализированные лаборатории в определенной мере отходит в прошлое. Следующей ступенью является модульная Front & Backend автоматизация, которая также может быть экономически оправданной при достаточно большом объеме рабочей нагрузки и настоятельной потребности сокращения расходов на оплату труда персонала. В этом варианте начальные капиталовложения и ожидаемые экономические результаты могут быть легко просчитаны. Кроме того, в этом варианте интеграция лаборатории может достигаться постепенно, путем приобретения и освоения модуль за модулем. Полностью автоматизированная лаборатория требует значительных первоначальных расходов, полной перестройки всего лабораторного процесса и возможна лишь при наличии достаточно просторного общего помещения. Поэтому рациональнее всего такой способ осуществлять при проектировании и создании нового большого медицинского центра или при полной реконструкции ранее существовавшего. Понесенные при создании такой полностью автоматизированной лаборатории расходы оправданы лишь при ежедневном поступлении достаточно большого числа образцов биоматериалов. Так, по данным N.Tatsumi (1998), в упоминавшейся выше полностью автоматизированной лаборатории медицинского центра Университета г.Осака ежедневно анализируется от 3000 до 4000 образцов, причем приблизительно 80% всех исследований выполняется с участием 4-6 опытных лабораторных технологов. Высокая производительность лаборатории обеспечивается полностью компьютеризированной системой коммуникаций с клиническими отделениями больницы.

Приближение исследований к месту лечения пациента

Существуют и некоторые идейные возражения против тенденции все большего укрупнения лабораторий. Они вытекают из того обстоятельства, что более крупные лаборатории становятся и все более удаленными как физически, так и технологически от конкретного пациента и от курирующего его врача, назначающего исследования, осмысливающего и использующего их результаты. На этой основе возникла противоположная тенденция приближения выполнения анализа к месту наблюдения за пациентом («bed-side analyses», «point-of -care laboratory tests»). Основной выгодой от внедрения такого способа выполнения лабораторных исследований является практически моментальное получение леча-

щим врачом лабораторной информации о состоянии пациента. Наиболее настоятельно такая потребность в немедленном получении информации проявляется у врачей в операционных, в реанимационных отделениях, в палатах интенсивной терапии .

Характер задач, решаемых этими категориями специалистов, диктует и выбор круга исследований, ответы на которые им необходимо знать насколько возможно быстро для быстрой ориентации в критическом состоянии пациента(Табл. 6).

Для удовлетворения этой клинической потребности проявилась тенденция «near-patient testing» (NPT), т.е. такой организации лабораторного обслуживания больных в критических состояниях, когда обычные лабораторные приборы, выполняющие наиболее срочные анализы (преимущественно исследования газов крови, электролитов, лактата, гемоглобина, гематокрита), располагаются в непосредственной близости от операционной или реанимационного отделения, образуя специальное лабора-

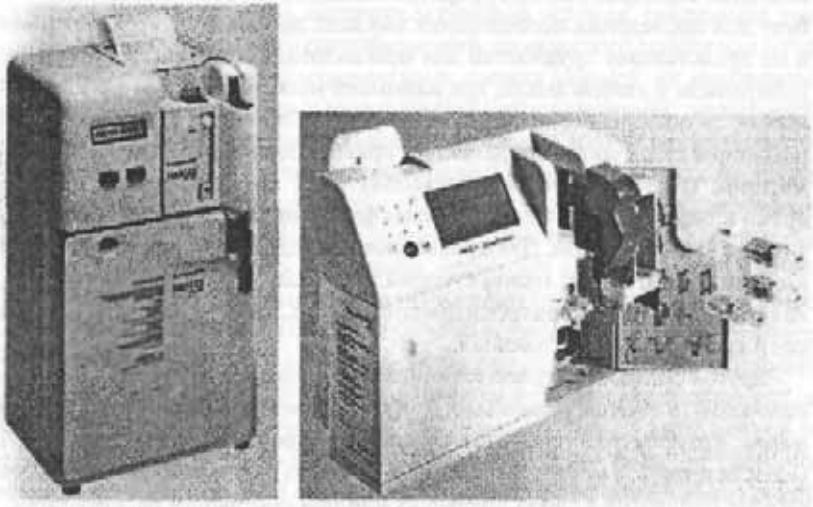
Таблица 6

Срочные лабораторные исследования у постели пациента

Тесты	Цель исследования	Наличие приборов
pH, pCO_2, pO_2 sO_2, BE, Hb, Hct лактат	Раннее обнаружение изменений оксигенации, вентиляции, и КЩС необходимо для своевременной их коррекции	Да
Na, K, Ca_i	Необходимо при лечении пациентов в критических состояниях; быстрые изменения содержания калия и кальция требуют определения у постели пациента	Да
Глюкоза	Лечение инсулин- зависимого диабета, быстрое купирование гипогликемии	Да
Лекарства	Необходимо в палате интенсивной терапии новорожденных, отделениях химиотерапии и отделениях скорой помощи	Да/нет
Креатинин, в сывор./моче	Слежение за проявлениями нефротоксичности при медикаментозной терапии	Да/нет

торное подразделение - экспресс-лабораторию. При этом достигается значительный выигрыш во времени: если срочное выполнение исследований в основной лаборатории учреждения требует - с учетом расстояний и ритма работы приборов - 30-60 мин., то в приближенной к месту хирургического или интенсивного лечения больного лаборатории исследование может быть выполнено за 5-15 мин. Такое сокращение «turn-around time», т.е. времени оборота биоматериала и информации о его составе, может иметь жизнеспасающее значение.

Исследование газов крови и электролитов в приборном отношении обеспечено достаточно надежно с помощью специализированных приборов фирм «Radiometer», «AVL» (ныне в составе «Roche Diagnostics», «Nova» и ряда других в соответствии с технологиями, описанными выше (см. раздел «Основные лабораторные технологии и оборудование»).На рис. 55 представлены ион-селективные анализаторы для исследований электролитов EasyLyte и для исследования газов крови EasyBloodGas фирмы «Medica Co.» (США), распространяемые в России фирмой «Аналитика». Первый из этих приборов выпускается в нескольких модификациях, позволяющих исследовать натрий, калий, кальций, хлориды, pH в



а б

Рис. 55. Ионоселективные анализаторы фирмы «Medica Co» (США), а) Ионоселективный анализатор электролитов EasyLyte. б) Ионоселективный анализатор газов крови EasyBloodGas.

различных комбинациях, а второй измеряет pH, pCO2 и pO2, а при введении данных о температуре тела пациента, концентрации гемоглобина - рассчитывает весь комплекс показателей кислотно-основного состояния. Показатели результатов исследований, выполненных на таких приборах, могут быть получены достаточно быстро в экспресс-лаборатории, расположенной в непосредственной близости от места проведения хирургического вмешательства или интенсивного лечения пациента, находящегося в критическом состоянии, и выведены на мониторы, в операционной или в реанимационном отделении. Возможно также внеочередное выполнение таких исследований в основной лаборатории больницы благодаря «свободному доступу» к большинству современных анализаторов. В последнее время фирмой «AVL Medical Instruments UK Ltd.» (Англия) предложен портативный автоматический анализатор для критических состояний OPTI, в котором используются одноразовые мультисенсорные кассеты, позволяющие за несколько секунд определить весь набор необходимых для оценки состояния пациента параметров: pH, гемоглобин, насыщение крови кислородом, газы крови и электролиты. Устройство прибора, оснащенного оптическими сенсорами, встроенной системой калибровочного буфера и стабильными тест-кассетами не требует для проведения исследования никаких дополнительных реактивов и не представляет трудностей для использования любым медицинским работником в любом месте, где возникает необходимость в таких срочных исследованиях (рис. 56). Основную проблему для правильного определения газов крови представляет правильное взятие материала в герметично закрытую емкость, поскольку даже краткий контакт образца крови с окружающей пациента атмосферой может существенно извратить результат анализа. Для правильного определения калия существенно не допустить даже малой степени гемолиза, так как высвобождение калия лишь из 0,5% эритроцитов достаточно, чтобы повысить уровень его в сыворотке на 0,5 ммоль/л.

Другой большой группой клиницистов, которые нуждаются в безотлагательном (в течение нескольких минут) получении лабораторной информации, что получило условное наименование «point-of-care testing», POCT (« исследование в месте наблюдения и лечения») - это семейные врачи при приеме пациентов в своих приемных или при посещении на дому прикованных к постели пациентов. Характер и темп развития патологических состояний в этих ситуациях несколько иной, чем при критических состояниях у пациентов в стационарах. Чаще всего при этом необходима общая

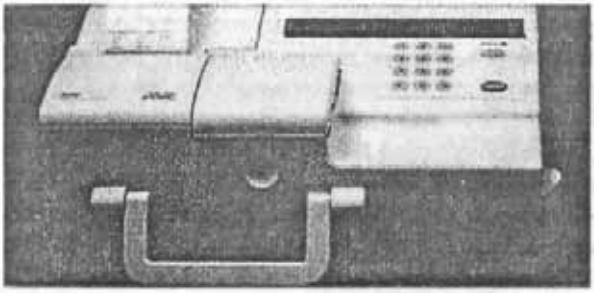


Рис. 56. Портативный анализатор кислотно-основного состояния и электролитов OPTI («AVL Medical Instruments UK Ltd.», Англия).

ориентация в состоянии пациента, мониторинг течения хронического заболевания, хотя иногда и здесь может возникнуть необходимость быстрой диагностики опасного для жизни развития болезни. Для удовлетворения этих клинических потребностей оказывается необходимым исследование обычных химических компонентов мочи, глюкозы в моче и крови, гликированного гемоглобина, холестерина, гемоглобина, сердечных маркеров, показателей свертывания крови, некоторых лекарств.

Поскольку выполнение ряда исследований имеет тенденцию перемещения из стен лабораторий в палаты клинических отделений, в офисы семейных врачей, на дом к пациенту, в полевые условия, реализация этой идеи потребовала и своего специфического технического оснащения и своеобразных особенностей материальных средств анализа: их компактности, готовности реагентов к немедленному использованию, способности анализировать биоматериал без пробоподготовки, миниатюрности аналитических систем и возможность визуальной детекции результатов, портативности приборов для количественной оценки результатов исследований, возможности их использования персоналом без специальной профессиональной подготовки (а в отношении отдельных исследований - самими пациентами в порядке самоконтроля). Следует сказать, что и наука, и промышленность успешно справились с этой задачей. Более того, разработка портативных устройств для определения различных аналитов в биоматериалах развивается особенно бурно, поскольку их могут использовать не только клинические лаборатории, где основная работа выполняется на высокопроизводительных приборах, анализирующих большие серии однородных анализов, но и клинический персонал, непосредственно обслуживающий больных в больничных отделениях, врачи общей практики, сами пациенты, т.е. рынок подобных устройств гораздо шире, чем число традиционно организованных лабораторий.

В настоящее время существует и постоянно расширяется арсенал аналитических систем и приборов, которые возникли на стыке двух тенденций: миниатюризации химических и иммунохимических средств анализа и миниатюризации аппаратуры для детекции и измерения продуктов происходящих с их помощью реакций.На такой технической и химико-биологической основе становится возможным расширение применения непосредственно возле пациента самых современных аналитических технологий , в т.ч. иммунологических, молекулярно-биологических и т.п., для диагностики все большего круга патологических состояний.

Прежде всего для этих целей были использованы т.наз. экспресс-тесты, т.е. **готовые аналитические формы из разряда «сухой химии»**. Принцип «сухой химии», впервые предложенный в конце прошлого века в виде индикаторных бумажек, а затем и для определения сахара в моче, заключается в использовании для анализа проб биоматериалов максимально компактного континуума, содержащего в сухой форме все ингредиенты, необходимые для специфической реакции с искомым аналитом. Собственно говоря, это можно рассматривать как миниатюрный набор реагентов, и поэтому информация о различных вариантах средств « сухой химии» содержится в разделе «Лабораторные реагенты» данного тома. Однако, эта форма набора реагентов имеет и некоторые особенности, поскольку в ней заложена и возможность детекции аналита в результате происходящей цветной реакции, т.е. это и аналитическое приспособление. Развитие этого принципа привело к разработке, производству и широкому использованию многочисленных вариантов этих приспособлений, различающихся по:

а/ виду и форме носителя (бумага, гель, нитроцеллюлоза);

б/ способу « компактизации» аналитической процедуры (диагностические полоски, многослойные аналитические элементы, иммунохроматографические тест-кассеты)

в/ виду биоматериала, для исследования которого они предназначены(моча, сыворотка, цельная кровь, иные биожидкости);

г/ способу детекции и регистрации результата анализа (визуальный, отражательная фотометрия).

Значительно облегчает выполнение исследований вне основной лаборатории появление приспособлений для быстрого (в течение 1 мин) разделения гепаринизированной цельной крови - т.наз. аксиальных сепараторных модулей.

Хотя тест-системы «сухой химии» являются разновидностью готовых форм реагентов, их аналитическое применение, а в ряде случаев и

ООО "БЕТАР КОМПАНИ"

Генеральный дистрибьютор британской фирмы
"ARCTIC MEDICAL Ltd."

Автоматический счётчик клеток крови Swelab AutoCounter AC 970EO+

МОДЕЛИ

Swelab AutoCounter AC 910EO+
Полуавтомат (6-19 параметров)
Простой, удобный и надёжный аппарат для небольших лабораторий.

Swelab AutoCounter AC920EO+
Автомат (10-19 параметров)
Высокая производительность, надёжность и точность анализов

Swelab AutoCounter AC 970EO+
Автомат (10-19 параметров)
В комплект поставки данной модели, включена эозинофильная приставка, благодаря чему этот прибор является одним из наилучших в своём классе.

* Приборы выдают до 4-х гистограмм, в зависимости от комплектации

ПАРАМЕТРЫ

RBC-эритроциты с гистограммой; HCT-гематокрит; MCV-средний объем эритроцитов; RDW%-ширина распределения RBC по размеру; HGB-гемоглобин; MCH-среднее содержание HGB в эритроците; MCHC-средняя концентрация корпускулярного HGB; PLT-тромбоциты с гистограммой; MPV-средний объем тромбоцитов; PCT-тробокрит; PDW%-ширина распределения тромбоцитов по размеру; WBC-лейкоциты с гистограммой; LYM-лимфоциты; LYM%-в % к WBC; MID-моноциты; MID%-в % к WBC; GRA-гранулоциты; GRA%-в % к WBC; EO-эозинофилы с гистограммой (опция)

Высочайшее качество послепродажного и послегарантийного сервиса гарантируется. Весь персонал прошёл обучение на фирме **SWELAB** в Швеции.

Аппараты "AutoCounter" SWELAB сертифицированы в соответствии с медицинскими нормами и требованиями безопасности Швеции (SEMCO), CE, Канады и США (CSA/NRLT/C и FDA), зарегестрированы Минздравом России. Фирма-производитель сертифицирована в соответствии с международным стандартом ISO 09001.

Наши координаты: ул. Куусинена, д. 21Б. Вн. тел.: 488; тел. 198-7721; тел./факс 943-0047, e-mail: jims@icsti.su

Издательство "ИНТЕРМЕДИКА"
представляет

Новое переработанное издание справочников в 3-х книгах
"Медицинские лабораторные технологии" (кн. 1,2)
"Медицинская лабораторная диагностика. Программы и алгоритмы"
Издание отредактировано и дополнено с учетом последних достижений в области лабораторной медицины.
ванный редактор – заведующий кафедрой биохимии Военно-медицинской академии, главный специалист по лабораторному делу Министерства обороны России, профессор **А.И. Карпищенко**.

В справочниках представлены основы лабораторной аналитики, контроль качества исследований, оборудование и техническое оснащение лабораторий. Изложены унифицированные методы исследования биологических материалов: крови, мокроты, кала, экссудатов и транссудатов, цереброспинальной жидкости, желудочного и дуоденального содержимого, эякулята, амниотической и влагалищной жидкости, а также исследования на простейших и гельминты.

Описаны методы клинической биохимии, оценки кислотно-основного состояния, водно-электролитного обмена и системы гемостаза. Подробно изложены техника бактериологических и иммуномикробиологических исследований. Отдельным блоком представлены иммуноферментный и радиоиммунный анализ, цитологический метод, а также молекулярнобиологическте и цитогенетические методы.

Материал изложен по единой схеме: краткая характеристика исследуемого биологического материала, конкретного определяемого компонента, принцип метода определения, реактивы, ход исследования. Приведено содержание определяемых компонентов у здорового человека и их клинико-диагностическое значение.

В кн. III представлены программы и алгоритмы клинической и лабораторной диагностики наиболее часто встречающихся заболеваний и синдромов. Представлены современные данные по их этиологии, патогенезу, мониторингу течения и контролю за лечением. Книга предназначена для специалистов клинической лабораторной диагностики, врачей клиницистов, студентов медицинских учебных заведений.

Заказать книги можно по адреу:
194100, Санкт-Петербург а/я 8, издательство "Интермедика".

тел./факс: (812) 274-7389, 271-3613
e-mail: intmedic@mail.wplus.net

сама их конструкция, тесно связывают их с определенными видами лабораторного оборудования, специально разработанными для использования только с этими видами готовых аналитических форм.

Широко известны диагностические полоски, предназначенные либо для одного анализа (моно-тесты), либо нескольких анализов из одной пробы биоматериала (поли-тесты). Совершенствование этих тест-полосок и способов детекции получаемых с их помощью результатов привело к формированию довольно обширной группы аналитических систем, дающих количественные результаты на основе измерений, выполняемых отражательными фотометрами (впервые предложены в 1969 г. фирмой «Ames», технологические основы измерения - см. раздел «Основные технологии и оборудование»). В качестве примера такого прибора, ориентированного на измерение результатов одиночных или небольших серий анализов мочи с помощью тест-полосок, удобного для оснащения небольших лабораторий или офисов семейных врачей, можно привести Urilux S («Roche Diagnostics», Швейцария)(рис. 57). В настоящее время на рынке лабораторных приборов представлено немало вариантов полуавтоматических и полностью автоматизированных анализаторов мочи, основанных на использовании сочетания «сухой химии» и отражательной фотометрии (см. табл. 7, 8).

Рис. 57. Компактный отражательный фотометр Urilux S для анализа состава мочи с помощью тест-полосок Combur Test M («Roche Diagnostics», Швейцария).

Таблица 7

Сравнительные характеристики некоторых полуавтоматических анализаторов для клинического анализа мочи

Наименование, фирма, страна/ характеристики	Urilux	Miditron Junior	Miditron M	Rapimat Behring, Германия	UriMatic-lab III CSF Elettronica S.r.l., Италия	URiSCAN Yeang Dong, Ю.Корея
	F.Hoffmann La Roche, Швейцария					
Принцип работы	«сухая химия на полосках», отражательная фотометрия					
Отражательный фотометр:						
-источник света		3светоизлуч. диода	2головки с 3 диодами каждая			
-длина волны, нм		557, 620 656	555, 620, 660		560, 610, 640	
-поправки:	+	+	+	+	+	
–на цвет мочи;	+	+	+	+	+	
–на мутн. мочи		+	+			
Полоска:	Combur 10 Test			Rapignost	Rapignost Total Screen L SG (Behring Institut)	URiSCAN 6–11 показателей
-закрытая сист; -открытая сист.	+			+	+	+
Идентификация проб пациентов		штрих-код, введение номера, кода, имени пациента с клавиатуры		штрих-код, введ. номера, кода, имени пациента с клавиат.	вручную	вручную
Аналиты:						
-аскорбиновая кислота;	-*	-*	-*	+	+	+
-белок;	+	+	+	+	+	+
-билирубин;	+	+	+	+	+	+
-глюкоза;	+	+	+	+	+	+
-кетоновые тела;	+	+	+	+	+	+
-кровь;	+	+	+	+	+	+
-лейкоциты (эстеразалейкоцитов)	+	+	+	+	+	+
-нитриты;	+	+	+	+	+	+
-относительная плотность;	+	+	+	+	+	+
-pH;	+	+	+	+	+	+
-уробилиноген;	+	+	+	+	+	+
-гормоны	–	–	–	–	+ (ЛГ,ХГ, тест-полоски фирмы Applied Biotech, Inc., США)*	
Показатели:						
-цвета мочи;			+			
-мутности			+			
Комп. осадка мочи			+			
-принцип анализа:						
-микроскопия;			+**			
-авт. сист. распознавания образов;						
-проточная цитофлуорометрия.						

Наименование, фирма, страна/ характеристики	Urilux	Miditron Junior	Miditron M	Rapimat Behring, Германия	UriMatic-lab III CSF Elettronica S.r.l., Италия	URiSCAN Yeang Dong, Ю.Корея
	F.Hoffmann La Roche, Швейцария					
Емкость пробо-накопит., шт. полосок	1	1	1	1	1	6
Объем пробы, мл	10	10	10	10	10	10
Очистка полоски мочи перед исслед. -требуется; -не требуется	+	+	+	+	+	+
Время инкубации, с	60	60	60			60
Время, с: -измерения; -анализа	60	36***	12			
Калибровка	калибровочная полоска			калибровоч-ная полоска	калибровоч-ная полоска	калибровоч-ная полоска
Контроль качества	коммерчес-кие контр. материалы	контрольная полоска		Behring Urine Controls Levels I,II	?	

Способ выдачи результатов: -дисплей; -принтер; -кач. (+,-); -колич. (ед. СИ); -сигнализация. о патолог. рез-те	+ +встроен. + + +	+ +встроен. + + +	+ +встроен. + + +	+ +встроенный + + +		+ +встроенный +
Автоматич. удаление полоски после измерения	+	+****	+****	+		+
Производитель-ность полосок /ч	80	100***	300	360		360
Интерфейс к компьютеру: -одно- -двусторонний	+	+	+	+(опция) +	+	+
Хранение данных: -пациентов; -результатов	–	+300 3000 (300 тестполосок)	+ +300 3000 (300 тестполосок)	+300	–	
Масса, кг	0,415	7,45	15	9,5		5,4

Примечания:

F.Hoffmann La Roche*Интерференция аскорбиновой кислоты отсутствует;

**Возможно введение данных микроскопии on line

***Имеется режим ускоренного измерения, в этом случае время измерения 12 с, производительность300 тест-полосок/ч.

****Удаление использованных полосок производится 1 раз в день в течение 1 мин. Обычная бумага для принтера Miditron Junior

UriMatic-lab III.*Иммунохимический тест на полосках, выполняется на отдельном держателе полосок.

Наименование, фирма, страна/ характеристики	Urilab[1], Callegari, Италия	LabUReader, 77Elektronika, Венгрия	Uritek TC-101, TECO DIAGNOSTICS, США	Clinitek 50	Clinitek 100	Clinitek 200	Clinitek 500
				Bayer, США			
Принцип работы	"сухая химия" на полосках, отражательная фотометрия						
Отражат. фотометр:	+	+	+	+	+	+	+
-источник света	+			светодиоды двуволнов. измер.	светодиоды двуволнов. измер.	светодиоды двуволнов. измер	светодиоды двуволнов. измер
-длина волны, нм		460,550,650					
поправки:							
-на цвет мочи;				+	+	+	+
-на мути. мочи	+						+
Полоски	Rapignost Total Screen[2]	LabStripU10, LabStripU11соотв. для 10 или 11 аналитов	URS-10	Multistix10 SGдля 10 аналитов или Multistix 8 SG для 8 аналитов			Multistix 10SG,9SG, 8SG ,SG Multistix N-Multistix
Идентификация проб пациентов		вручную, с клавиатуры, штрих-код	с клавиатуры	нет	автомат., вручную, с клавиатуры	ручной ввод, штрих-код	ручной ввод, штрих-код
Аналиты:							
-аскорбиновая кис-та	+	+*	–	–	–	–	-
-белок;	+	+	+	+	+	+	+
-билирубин;	+	+	+	+	+	+	+
-глюкоза;	+	+	+	+	+	+	+
-кетоновые тела;	+	+	+	+	+	+	+
-кровь;	+	+	+	+	+	+	+
-лейкоциты (эстераза лейкоцитов)	+	+	+	+	+	+	+
-нитриты;	+	+	+	+	+	+	+
-относит. плотность;	+	+	+	+	+	+	+
-pH;	+	+	+	+	+	+	+
-уробилиноген;	+	+	+	+	+	+	+
-гормоны	–	-	–	–	+	+	
Показатели:							
-цвета мочи;							+[1]
-мутности							+[2]
Емкость пробоприемника, шт							
-полосок	1			1	1	1	
-пробирок							

Объем пробы, мл	10	10	10	10	10	10	10
Очистка полоски мочи перед исслед.							
-требуется;				+	+	+	
-не требуется	+	+	+*				+
Время инкубации, с			60	60	60	60	
Время, с:							
-измерения;		6		80			
-анализа	60						7
Калибровка			автокалибровка	калибровочная полоска			
Контроль качества			Liquid Urine Control	CHECK-STIX –контрольные полоски позитивные и негативные			Chek-StixCombo Pak,г контрольные полоски (поз., негатив.)
Способ выдачи результатов:							
-дисплей;		+		+	+	+	+*
-принтер;	+	+	+	+	+	+	+
-кач. (+,-);	+	+	+	+	+	+	+
-полуколич. (ед. СИ);	количественный						+
-сигнализация. о патолог. результате				+	+	+	+
Автоматич. удаление полоски					+	+	+
Производительность полосок /ч	ок.60	до 800	60	60	60*,48**	360	500
Хранение данных:							
-пациентов;				50	100	200	
-результатов		последние 3000					500
Масса, кг	ок. 60	10		1,2	3,9	13,6	6,5

Примечания:

Urilab. [1]Портативный анализатор мочи для децентрализованных исследований около пациента.

[2]Полоски фирмы Behringwerke, Германия. Прибор предназначен для количественного анализа компонентов мочи.

[3]Распечатанный на анализаторе ответ может быть вклеен в историю болезни.

Uritek TC-101. *Прибор имеет оригинальный механизм отсасывания излишков мочи на полосках с помощью насоса. Это обеспечивает отсутствие взаимного влияния проб и постоянную чистоту прибора.

Clinitek 50 ,100, 200. Clinitek 50 имеет 2 кнопки "Start"для операторов левшей и правшей, имеется опция на батарее. Могут быть использованы полоски Multistix 5, Uristix 4, Uro-Combistix SG, а для калибровки так называемый референтный блок. На Clinitek 50, 100 имеется возможность исследовать микроальбуминурию и КТ; с 2001 года предполагается использовать новые тест-полоски Multistix-Pro с большей чувствительностью на белок. На **Clinitek 100** могут быть использованы 3 типа тест-полосок: Multistix10 SG, M9, Uristix SG. Программирование проводится с помощью программной карты.

*При считывании с дисплея; **распечатанных результатов.

Clinitek 500. * Сенсорный цветной дисплей. 1)желтая, оранжевая, красная, зеленая, голубая, коричневая; 2)прозрачная, слегка мутная, очень мутная.

Таблица 8

Сравнительные характеристики некоторых автоматических анализаторов для клинического анализа мочи

Наименование, фирма, страна / характеристики	Supertron, (Boehringer Mannheim, Германия) F.Hoffmann La Roche, Швейцария	Clinitek Atlas, Miles, США	Super Aution SA–4220 A. Menarini Diagnostics, Италия
Принцип работы	"сухая химия" на полосках, отражательная фотометрия		
Отражательный фотометр	+	+	+
-источник света		галогеновая лампа	
-длина волны, нм		двуволновое измер-е	550, 620, 720
-поправки:			
-на цвет мочи;	+	+	
-на мутность мочи		+	+
Полоски:	Combur 10	полоски в рулонах по 490шт	UrileiS, Aution stick8
-закрытая система;	+	+	+
-открытая система			
Идентификация проб пациентов	штрих-код (опция)	Ручной ввод, штрих-код	
Аналиты:			
-аскорбиновая к-та;	–	–	–
-белок;	+	+	+
-билирубин;	+	+	+
-глюкоза ;	+	+	+
-кетоновые тела;	+	+	+
-кровь;	+	+	+
-лейкоциты (эстераза лейкоцитов);	+	+	+
-нитриты;	+	+	+
-относительная плотность;	+	*)	*)
-pH;	+	+	+
-уробилиноген;	+	+	+
-гормоны	-	–	–
Показатели:			
-цвета мочи;		+	
-мутности мочи		+	
Емкость пробонакопителя, -шт. полосок			
-пробирок с мочой	60	50	50
Объем пробы, мл	6-10	2,10	2,10

Возможность исслед-и разведенной пробы	+		
Очистка полоски перед исследованием: -требуется; -не требуется	+	+ (прямое пипетирование мочи)	+
Время инкубации, с		2	
Срочные анализы	+ с прерыванием серии	+	+
Калибровка	калибровочная полоска	Жидкие калибровочные растворы	калибровочная полоска
Контроль качества	коммерческие контрольные материалы	контрольные полоски	
Способ выдачи рез-та: -дисплей; -принтер; -кач. (+,-); -полуколич. (ед.СИ); -сигнализация о патологическом рез-те	+ + + + +	+ внешний + + +	+ + + + +
Автоматич. удаление полоски из прибора	+	+	+
Производительность, полосок /ч.	>250	200	250
Интерфейс к компьютеру: -односторонний; -двусторонний	+	+ +	+
Хранение данных: -пациентов, -результатов.	999	1000+200 калибровочных и контрольных проб	
Масса, кг	45	66,2	38,6
Примечания		*)определяется на основе измерения индекса преломления света	*)измеряется специальным зондом на основе индекса преломления света

Особенно широкое применение в практике индивидуального контроля за состоянием больных сахарным диабетом, в том числе и в порядке самоконтроля, нашли портативные глюкометры, основанные на количественном определении содержания глюкозы в крови с помощью тест-полосок. Тестовая зона полоски содержит иммобилизованные ферменты - глюкозоксидазу и пероксидазу, а также редокс-индикатор, например, *о*-толидин. Глюкозооксидаза катализирует реакцию между глюкозой и кислородом воздуха с образованием глюконовой кислоты и перекиси водорода. Пероксидаза катализирует реакцию перекиси водорода с индикатором, который окисляется с образованием окрашенного соединения, изменяя первоначальную окраску тестовой зоны полоски. Изменение окраски пропорционально концентрации глюкозы в крови. После нанесения крови на тестовую зону полоски оператор запускает работу глюкометра нажатием кнопки «Старт», в результате чего запускается и встроенный в прибор секундомер. По истечении определенного времени, чаще всего 1 мин., кровь стирается с тестовой зоны полоски и она помещается в измерительное гнездо фотометра. (В большинстве современных портативных глюкометров удаление крови с полоски не требуется, регистрация времени реакции осуществляется автоматически). Количество света, отраженного от тестовой зоны и попавшего на светодиод, измеряется и преобразуется в числовое значение концентрации глюкозы, которое высвечивается на дисплее. Сравнительные характеристики некоторых отечественных и зарубежных портативных глюкометров, основанных на отражательной фотометрии, приведены в таблице 9.

Простота и быстрота выполнения исследования, калибровка прибора(в некоторых случаях - автоматическая), специфичная для каждой партии полосок, возможность проверки качества исследований с помощью специальных контрольных полосок, которые измеряются через определенное количество измерений на тест-полосках проб пациентов - все эти качества современных портативных глюкометров способствуют их широкому применению. Предпочтение оказывается приборам, не нуждающимся в снятии капли крови перед измерением, так как эта процедура создает дополнительные источники ошибок. Надежные результаты могут быть получены при условии строгой стандартизации работы приборов и соблюдения инструкций производителя по выполнению анализов: соблюдения правил нанесения крови на тестовую зону; соблюдения установленного для данного прибора и соответствующих тест-полосок времени реакции; использования цельной крови, гематокрит которой в пределах значений, регла-

ментированных изготовителем; учета интерференции некоторых лекарств (аскорбиновой кислоты, L-допа), если она установлена для данного типа полосок, а также интерференции некоторых компонентов состава исследуемой крови в ферментативной реакции - повышенного количества билирубина, холестерина, триглицеридов); четкого инструктирования пользователей без медицинского образования; периодической проверки результатов путем параллельного определения глюкозы в крови референтным методом в лаборатории; соблюдения сроков и правил хранения тест-полосок: не использовать полоски с истекшим сроком действия, исключить действие на них влаги, света, прямых солнечных лучей, нагревания; использования тест-полосок, предназначенных только для данного прибора; проведения калибровки и очистки прибора в соответствии с требованиями изготовителя. Если прибор используется не для самоконтроля самим пациентом, а для обследования многих пациентов, взятие крови и работа на глюкометре должны осуществляться в перчатках, с соблюдением всех правил дезинфекции рабочего места и прибора.

Наряду с моноцелевыми отражательными фотометрами, разработаны полуавтоматические и полностью автоматические измерительные приборы для регистрации результатов различных биохимических исследований биоматериалов с помощью средств « сухой химии». Так, комплекс диагностических полосок «Рефлотест» с отражательным фотометром «Рефлотрон» представляет собой целую биохимическую лабораторию, не нуждающуюся в пробоподготовительных этапах и позволяющую получать информацию последовательно по 16 популярным биохимическим параметрам или по любой комбинации из них за несколько минут из пробы цельной крови. Устройство полосок «Рефлотест»(см. раздел «Лабораторные реагенты») позволяет производить непосредственно в полоске отделение жидкой части крови от форменных элементов с последующим проведением анализа плазмы. Все необходимое для работы с этой аналитической системой умещается на письменном столе(рис. 58).

Принцип «сухой химии» с некоторыми видоизменениями применяется и в коагулологии . Примерами могут служит тест-полоски для определения протромбинового времени на приборе Coagucheck («Roche Diagnostics»), диагностические карточки NicoCard («Nicomed», Норвегия) для определения Д-димеров визуально по цветной шкале или с помощью специального ридера.

Предложенная в 70-х годах фирмой «Кодак» технология многослойных сухих аналитических элементов была применена для выполнения

Таблица 9

Сравнительные характеристики некоторых отечественных и зарубежных портативных глюкометров, основанных на отражательной фотометрии

Характеристика	Название прибора, фирма-изготовитель, страна					
	Глюкометр ГосНИИ биологического приборостроения МЗ РФ, ЗАО "Биоприбор", Россия	Accu-Chek Boehringer «Mannheim» Германия	Accutrend GC Easy «Boehringer Mannheim» Германия (ныне «Hoffmann La Roche», Швейцария)	Supreme bG «Hypoguard» Великобритания	One TouchII «Lifescan» США	Glucometer Encore «Miles» США
Название тест-полоски	Глюко- фото хром БП-"М"	Easy	Accutrend Glucose Accutrend Cholesterol	Supreme	One Touch	Glucometer Encore
Наличие цветной шкалы на упаковке тест-полосок	+	+	ограничено	-	-	+
Цельная кровь	капиллярная	Капиллярная	Капиллярная	Капиллярная	Капиллярная или венозная	капиллярная
Объем пробы в мкл.	Ок 25	15	11 (глюкоза), 14 (холестерин)	7	10	10
Удаление крови с тест-полоски перед измерением	не требуется	не требуется	не требуется	не требуется	не требуется	не требуется
Продолжительность измерения	15 (120 с нанесением крови)	60	12 (глюкоза), 180 (холестерин)	55	45	15-60
Диапазон определения концентраций глюкозы, ммоль/л	1,5- 25	1,11-27,75	1,11-33,0	2,22-22,0	0-33,0	0,55-33,0
Допустимые пределы гематокрита	Не указаны	30-55	35-55	35-65	25-60	20-60
Проверка калибровки прибора	калибровочные полоски	внутренняя автоматическая при каждом включении прибора	по коду тест-полос-ки при каждом измерении	внутренняя автоматическая при каждом измерении	контрольная полоска ежедневно	контрольная полоска ежедневно
Введение калибровки для каждой серии тест-полосок	+	+	+	+	+	+
*Контрольные материалы	—	контрольные растворы глюкозы (5 значений концентраций	котрольные растворы глюкозы (2 знач. концентраций)	контрольный раствор глюкозы	контрольный раствор глюкозы	контрольные материалы в обл низких, нормальных и высоких знач. конц-ий.
Кол-во результатов, хранящихся в памяти микропроцессора	126	350	50 (глюкоза) 15 (холестерин)	14	250	10
Автоматическое отключение через..., мин.	2	3	1 (без полоски) 2 (с полоской)	1 (без полоски) 5 (после установки тест-полоски) 2 (после получения результата)	2 (после включения)	3
Кол-во анализов, которое может быть выполнено с 1 заправкой батарей	Ок 1000	Ок. 1000	Мин. 1000	Ок. 1000	Ок. 1000	

Рис. 58. Компактный экспресс-анализатор крови Reflotron IV («Roche Diagnostics», Швейцария). С применением тест-полосок Reflotest производится быстрое (максимальное время анализа 5 мин.) количественное определение ферментов АлАТ, АсАТ, амилазы общей и панкреатической, ГГТ, КК, щелочной фосфатазы; белка гемоглобина; метаболитов билирубина, глюкозы, креатинина, мочевины, мочевой кислоты, триглицеридов, холестерина; электролита калия.

различных видов исследований первоначально в небольших отражательных фотометрах, которые могли бы использовать частно-практикующие врачи. Теперь существуют такие элементы не только для колориметрических анализов, но и для потенциометрических и иммунореактивных конкурентных и неконкурентных исследований. Схемы устройства этих разновидностей многослойных аналитических элементов описаны в разделе «Лабораторные реагенты». На основе использования этих элементов создана серия приборов Vitros различной производительности. Как и другие средства «сухой химии», многослойные аналитические элементы представляют собой не только миниатюрные наборы реагентов, но и компактные устройства для направленного осуществления аналитической процедуры .

В практике находят применение и другие варианты аналитических систем, сочетающих тот или иной способ компановки сухих реагентов с объективной детекцией продуктов их реакции с искомым аналитом в приборе небольшого размера. Stat-Site System фирмы «GDS Technology, Inc.» представляет собой миниатюрный многоволновой отражательный фотометр - детектор количественных результатов быстрого определения компонентов цельной крови: гемоглобина, общего холестерина, глюкозы, кетонов, а также ацетаминофена и теофиллина с помощью много-

слойных тестовых карточек (Рис. 59). Система Piccolo(«Abaxis», США) также характеризуется как многоцелевой биохимический анализатор крови, способный применяться в месте обследования и лечения пациента (рис. 60). В этом анализаторе используются специальные одноразовые пластиковые диски, в отсеках которых содержатся лиофилизированные реагенты, предназначенные для определенных биохимических тестов или их набора, ориентированного на решение определенной диагностической задачи (например, печеночная панель), а также растворитель. Время анализа - до 15 мин.

Многие довольно широко применяемые иммунохроматографические тест-кассеты, внешне выглядя довольно примитивными и не требуя особенно высокой квалификации при их применении, на самом деле аккумулируют по- настоящему высокие технологические принципы и аналитические возможности. Так, например, одноразовые миниатюрные кассетные устройства для быстрого визуального(т.е. без необходимости применения каких либо измерительных приборов) определения наличия в крови пациента миокардиальных белков тропонина и миоглобина основаны на методе иммунохроматографии с использованием специфических моноклональных антител, меченых коллоидальным золотом (сокращенное название этого типа экспресс-тестов GLORIA, что расшифровывается как Gold Label Optical Rapid Immuno Assay). Они дают возможность уже в первые часы после приступа сердечных болей подтвердить или отвергнуть наличие инфаркта миокарда. Из таких кассетных тестов может быть составлен целый комплекс, позволяющий не только установить наличие поражения миокарда по наличию в крови пациента тропонина I, миоглобина и фракции МВ креатинкиназы, но и оценить степень возможной помехи тромболитической терапии препаратами стрептокиназы, проведя тест на антистрептокиназу. На аналогичном принципе, с использованием других антител, основаны кассетные тест - системы для быстрого определения в биожидкостях хорионического гонадотропина (раннее установление беременности); для обнаружения простатического специфического антигена (диагностика рака предстательной железы); для обнаружения микроальбуминурии (диагностика нефропатии); для обнаружения белка, связывающего инсулино-подобный ростовой фактор I - маркер преждевременного разрыва плодной оболочки; для обнаружения злоупотребления лекарственными препаратами и наркотиками - бензодиазепином, опиатами, каннабиоидами, для детекции ЛДГ из плазмодиев малярии; для диагностики ротавирусов, вызывающих тяжелую

Рис. 59. Портативная многоцелевая аналитическая система Stat-Site («GDS»). а) Портативный многоволновой отражательный фотометр, б) Тест-карточка, в) Принципиальная схема аналитической технологии.

Рис. 60. Многоцелевой компактный биохимический анализатор крови Piccolo («Abaxis», США). Определение аналитов производится с помощью одноразовых пластиковых дисков, содержащих наборы лиофилизированных реагентов, позволяющих выполнять панель тестов для диагностики распространенных заболеваний.

диаррею у детей и т.д. Результаты исследований на некоторых иммунохроматографических тест-кассетах могут быть объективно зарегистрированы на соответствующих детекторах.

Жидкостная хроматография низкого давления в ее компактном варианте также предлагается в качестве одной из технологий в месте обследования пациента. Так, фирма «Bio-Rad» рекомендует для быстрого и полностью автоматического измерения гемоглобина HbA_{1c} DiaSTAT Analyser, который представляет собой жидкостную хроматографическую систему низкого давления. Одноступенчатое определение содержания в капиллярной крови гликированного гемоглобина выполняется за 10 мин. (рис. 61).

Приборы для быстрого определения отдельного аналита могут быть основаны не только на средствах «сухой химии», но и на прямом фотометрическом или электрохимическом определении аналита (например, глюкозы) в биоматериале.

Портативные глюкометры-фотометры обычно используют одноразовую миниатюрную кювету из прозрачного пластика, содержащую необходимые для определения глюкозы реактивы, в том числе реактив, вызывающий гемолиз, и реактивы, вызывающие образование окрашенного соединения, по светопоглощению которого прибор рассчитывает концентрацию глюкозы. Анализатор глюкозы в крови фирмы «HemoCue»(табл. 10) (рис. 62) располагает самонаполняющейся микрокюветой с сухими

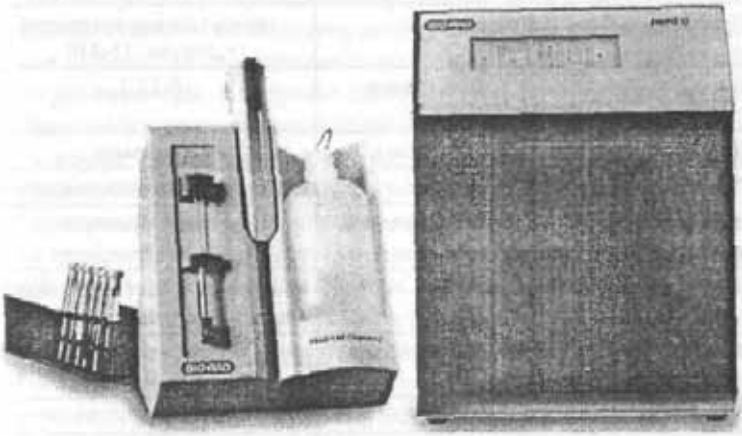


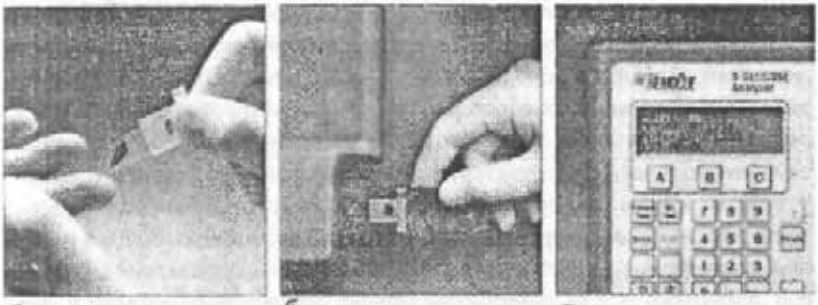
Рис. 61. Компактная жидкостная хроматографическая система низкого давления для быстрого (время анализа 10 мин) определения гликированного гемоглобина Alc DiaSTAT Analyser («Bio-Rad»).

реактивами, в которую благодаря капиллярному эффекту поступает кровь из прокола пальца и смешивается с реактивами. Фотометрия производится на двух длинах волн света, что позволяет автоматически компенсировать фоновое значение. Прибор имеет детектор штрихового кода для идентификации проб и пациентов, память с емкостью до 1000 результатов с данными идентификации, даты и времени анализа, а также связь с принтером для печатания результатов, интерфейсы с общим принтером лаборатории, с персональным компьютером и центральной базой данных о пациентах. На основе того же технического оснащения гемоглобинометр той же фирмы измеряет низкие концентрации гемоглобина в крови за 45-60 сек. что позволяет использовать его непосредственно в операционных и в лабораториях переливания крови. В микрокювету прибо-

Таблица 10

Характеристика портативного глюкометра B-Glucose Analyzer HemoCue США

Название тест-полоски	HemoCue
Наличие цветной шкалы на упаковке	не указано
Цельная кровь	капиллярная или венозная
Объем пробы, мкл.	5
Удаление крови перед измерением	имеется вариант
Продолжительность измерения, с	зависит от концентрации глюкозы: 15-240
Диапазон определения концентрации глюкозы, ммоль/л	0-22,2
Допустимые пределы гематокрита	не указаны
Проверка калибровки прибора	контрольная кювета ежедневно
Введение калибровки для каждой серии кювет	не требуется
Контрольные* материалы	контрольные растворы глюкозы (2 уровня концентраций)
Количество результатов, хранящихся в памяти микропроцессора	ни одного
Автоматическое отключение через…,мин	нет
Количество результатов, которое может быть выполнено с 1 заправкой батарей	150ч работы



а б в

Рис. 62. Портативный фотометрический анализатор глюкозы и гемоглобина HemoCue. а) Нанесение на одноразовую микрокювету капли крови, б) Введение микрокюветы в анализатор, в) Представление результата исследования через 40-240 сек. на дисплее.

ра за счет капиллярного эффекта засасывается 10 мкл крови, которая затем в той же кювете подвергается гемолизу под действием натрийдезоксихолата, далее гемоглобин превращается за счет контакта с NO_2 в метгемоглобин, который, в свою очередь, реагируя с N_3,образует азидгемоглобин, измеряемый фотометрически при 570 и 880 нм (для компенсации возможных влияний)

Для быстрого определения билирубинемии как у новорожденных, так и у взрослых людей, используют, наряду с определением обычными методами на больших лабораторных анализаторах, моноцелевые приборы - билирубинометры. Измерение светопоглощения проходящего света в них проводится на двух длинах волн: 455 нм и 575 нм. Оптическая плотность, измеренная на длине волны 455 нм, пропорциональна концентрации билирубина и гемоглобина, а измеренная на длине волны 575 нм - пропорциональна только концентрации гемоглобина. Прибор автоматически пересчитывает результат измерения в единицы концентрации общего билирубина с помощью фактора, который рассчитан на основе исследования калибровочного раствора билирубина. В случае добавления в кювету диазореактива в присутствии прямого билирубина развивается цветная реакция и определение оптической плотности проводится аналогично спектрофотометрическому измерению общего билирубина. Время анализа - 5-10 мин.

Непосредственно у постели пациента (преимущественно - у новорожденных) билирубин можно исследовать и неинвазивным методом с помо-

щью трансдермального билирубинометра. Световодная головка - сенсор с источником возбуждающего света помещается на чистую (свободную от пигментации, сосудистого пятна или подкожной гематомы) кожу лба или груди (в области грудины) новорожденного. Отраженный от поверхности кожи свет разделяется на два луча с помощью дихроичного зеркала и измеряется двумя оптическими детекторами на длине волны 455 нм и 575 нм. Полученные результаты хорошо коррелируют с концентрацией билирубина в ткани, а она, в свою очередь, с концентрацией его в крови. В связи с меньшей достоверностью этого способа по сравнению с определением в крови его применяют для скрининга при оценке гипербилирубинемии у новорожденных с целью выявления группы риска для решения вопроса о необходимости дальнейшего лабораторного обследования. В таблице 11 приведены характеристики некоторых билирубинометров.

Амперометрические портативные глюкометры используют электрохимическую технологию, в которой капля крови наносится на биосенсор. Электрический ток возникает, когда глюкозооксидаза гидролизует глюкозу крови на глюконовую кислоту и перекись водорода, а специальные медиаторы, например, ферроцен, переносят электроны на зонд электрода, с помощью которого измеряется сила тока, пропорциональная концентрации глюкозы в пробе. Перед нанесением крови биосенсор вставляется в измерительное гнездо прибора, после нанесения капли крови удаления ее не требуется. Регистрация времени реакции осуществляется автоматически. В приборе « Glucometer Dex» фирмы «Байер» используется электрохимический сенсор, с которым реагирует глюкоза в пробе крови, взятой из пальца. Устройство для дозирования пробы состоит из капиллярной петли; поступление необходимого для анализа количества крови отмечается звуковым сигналом. Результат высвечивается на экране прибора через 30 сек. Обеспечена автоматическая калибровка. Прибор снабжен диском с 10 закрытыми фольгой сенсорами. Память прибора способна сохранить результаты до 100 проведенных тестов с указанием даты и времени анализа (рис. 63). В таблице 12 приведены характеристики некоторых электрохимических портативных глюкометров отечественного и зарубежного производства.

Весьма показательно, что появились многоцелевые биосенсорные портативные анализаторы, как например, электрохимический i-STAT, тест-картриджи для которого рассчитаны на быстрое выполнение из 2-3 капель свежей цельной крови 11 измеряемых (натрий, калий, хлориды, азот мочевины, глюкоза, ионизированный кальций, гемоглобин, гематок-

Таблица 11

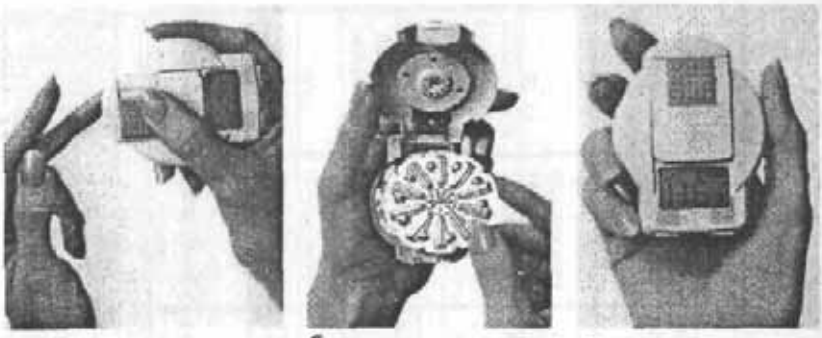
Сравнительные характеристики некоторых билирубиномеров

Характеристики	Фирма-изготовитель, страна, название прибора				
	НПО «Техномедика» Россия		Minolta Camera Co Ltd Япония	Bertocchi, Industry Electromedical, Италия	
	Билитест-М	Билимет	Jaundice meter	Gacomo Bilirubinometer Mod/GB-T3A	TotBil
Тип прибора	ручной	настольный	ручной	настольный	
Принцип измерения	трансдермальный	прямая спектрофотометрия	трансдермальный	прямая спектрофотометрия	Прямая фотометрия
Длина волны, нм	520/493	550/460		540/735	
Биожидкость для анализа	не требуется	плазма	не требуется	плазма	
Объем пробы	-«-	из 40мкл капиллярной крови		ок.90мкл капиллярной крови	
Время измерения, с.	1-2	1	10	1-2	
Вид билирубина	измеренный чрезкожно результат коррелирует с общим билирубином сыворотки	общий	измеренный чрезкожно результат коррелирует с общим билирубином сыворотки	общий	общий
Единицы	транскутанный индекс, (ТКИ)	мкмоль/л	транскутанный индекс, (ТКИ)	мг/100мл	мкмоль/л
Диапазон измерения ТКИ мкмоль/л мг/100мл	0-40, коррелир. с концентрацией 0-400	0-600	ТКИ, коррелир. с концентрацией 0-684	до 20	

Таблица 12

Характеристики некоторых электрохимических портативных глюкометров.

Характеристика	Название прибора, фирма-изготовитель, страна					
	Сателлит, ЗАО «Элтиа», Россия	Accu-Chek Advantage Roche Diagnostics, Швейцария	Glucocard Exac-Tech GT-1610. Pen, Card Kyoto Daiichi Kagaku, Япония	Precision Q.I.D. MediSense, США	Satellite	G Glucometer Miles, США
Название биосенсора	Сателлит	Advantage	Glucocard (запатентован)	Exac Tech	Precision Q.I.D Satellite D	Glucometer Elite
Цельная кровь	капиллярная	капиллярная или венозная	капиллярная	капиллярная или венозная	капиллярная	капиллярная
Объем пробы, мкл	10	3	10	10	10	3
Удаление крови с биосенсора перед измерением	не требуется	не требуется	не требуется	не требуется	не требуется	не требуется
Продолжительность измерения, с	40	40	60	30	20	60
Диапазон определения концентраций глюкозы, ммоль/л	1,8-35,0	1,11-33,3	2,2-25	1,11-33,3	1,11-33,3	0,55-33,3
Допустимые пределы гематокрита	35-55	35-55	35-55	35-55	35-55	35-55
Проверка калибровки прибора	калибровочные полоски	автоматическая при каждом включении прибора	тест-полоска при каждом измерении	автоматическая при каждом измерении	ежедневно	ежедневно
Введение калибровки для каждой серии биосенсоров	+	+	+	+	(сканнер бар-кода каждого биосенсора)	+
Контрольные материалы	контрольная полоска	контрольный биосенсор	контрольные растворы глюкозы (2 значения концентрации)	контрольный биосенсор	контрольные растворы глюкозы	контрольные материалы (3 значения концентрации)
Количество результатов, хранящихся в памяти микропроцессора	40	100 последний результат	последний	10	300 результатов пациентов 75 контрольных результат.	последний результат
Автоматическое отключение через ...мин	1	5	3	0.5	4	3
Количество анализов, которое может быть выполнено с одной заправкой батарей	ок.1000	ок.1000	ок.4000	ок.1000	ок.1500	ок.1000

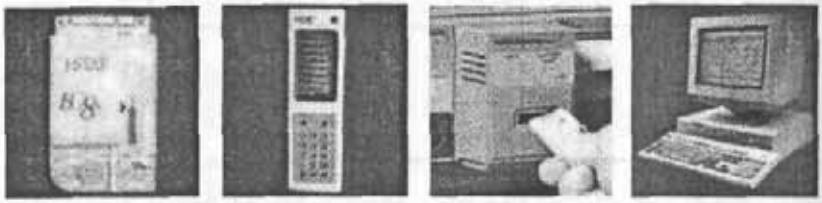


а б в

Рис. 63. Портативный фотометрический анализатор глюкозы и гемоглобина. а) Нанесение на одноразовую микрокювету капли крови, б) Введение микрокюветы в анализатор, в) Представление результата исследования через 40-240 сек. на дисплее.

рит, pH, pCO_2, pO_2) и 5 расчетных (HCO_3, общ. CO_2, избыток оснований, насыщение кислородом) тестов (в разных комбинациях) непосредственно клиническим персоналом в любой ситуации, которая требует срочной лабораторной информации(рис. 64 а, б, в, г).

Некоторые из достижений в этом направлении использованы и в обычной лабораторной деятельности в целях ее рационализации (использование диагностических полосок в качестве первичного скрининга при исследованиях проб мочи, использование многослойных аналитических элементов в автоматах различной производительности серии Vitros). В табл. 13 приведены характеристики некоторых автоматических анализаторов глюкозы.



а б в г

Рис. 64. Система экстренного выполнения исследований крови в месте обследования и лечения больного i-STAT. а) Одноразовый картридж, рассчитанный на одновременное выполнение от 1 до 8 лабораторных тестов, б) Ручной электрохимический анализатор. в) Модуль анализа крови, интегрированный в систему наблюдения за пациентом OmniCare CMS Monitors, г) Центральная установка для сбора данных о всех проведенных исследованиях и слежения за состоянием больных

Таблица 13

Сравнительная характеристика автоматических анализаторов глюкозы

Наименование фирма, страна	Принцип	Биожидкость	Диапазон определения, ммоль/л	Объем пробы мкл,	Вместимость стола пробоподготовки, кол-во позиций	Срок службы мембраны	Периодичность калибровки	Производительность	Память кол-во результатов	Выдача результата	Примечание
Biosen 5030 Кверти-Лаб, Россия	ферментатив-ный, амперометрический	кровь, сыворотка, плазма	0,5-40	20	13	3000 анализов	15 мин	90	60	дисплей	Возможно хранение проб до 48 часов. Автоматическое предупреждение об отказах. 1 позиция для срочного анализа, 2 позиции для контрольных проб. Простота замены мембран биосенсора
ECA 2000, Prufgerate Werk Medingen, Германия	-"-	Гемолизат, кровь, сыворотка, плазма, моча	0,6-50	10-20 кровь, сыворотка, плазма 5-моча	45	15 дней, или 3000 анализов		120		дисплей, термопринтер	Анализатор предназначен также для определения лактата
EBIO plus Eppendorf, Германия	-"-	-"-	0,6-50	10-20	60	-"-		160	60	дисплей, термопринтер	Анализатор предназначен также для определения лактата,1позиция для срочного анализа, 4 позиции для контрольных материалов, опция для считывания штрих-кода
EBIO compact Eppendorf, Германия	-"-	-"-	0,6-50	10-20	13	-"-		80	60	дисплей, термопринтер	1 позиция для срочного анализа, выполняемого максимально за 60 с

Следовательно, выполнение срочных исследований возможно тремя способами:

- во внеочередном порядке в общей лаборатории, в том числе, на автоматизированных приборах;
- в отдельной лаборатории, приближенной к месту лечения больного;
- непосредственно у постели больного нелабораторным персоналом.

Главными проблемами при развитии последнего направления является довольно высокая стоимость исследований, производимых в единичном порядке, а также необходимость обеспечения сопоставимости результатов этих исследований с результатами анализов, выполненных для тех же пациентов в лаборатории (соответствие методических принципов, пробоподготовка, контроль качества).

Для решения этой проблемы фирма «Roche Diagnostics» предлагает портативный комплекс AccuData GTS, где используются тест-полоски Advantage H и глюкометр Advantage. Комплекс осуществляет контроль качества результатов и может выдавать отчеты на принтер или на сопряженный компьютер с соответствующим программным обеспечением.

Организационным вариантом решения проблемы сопоставления лабораторной информации, полученной различными способами, может стать введение функции координатора POCT (Calvin, 2000), который практически организовывал бы инструктирование персонала клинических отделений относительно применения портативных средств анализа, обеспечивал бы систематическое проведение контроля качества исследований, вносил предложения по внедрению новых портативных средств анализа и т.п.

В качестве технического решения проблемы координации всех форм лабораторного обследования пациентов предлагается осуществлять сбор всех данных, полученных при обследовании больного в разных местах учреждения, на общем лабораторном компьютере, где они могут быть сопоставлены и соотнесены с результатами контроля качества(Рис. 65). Лабораторная информационная система в этом случае выполняет роль интегратора всей лабораторной информации, полученной различными способами, в том числе и на отделении от основной лаборатории.

В известной мере дальнейшим расширением рамок охвата лабораторной информационной системы за пределы одного учреждения и даже одного региона является **дистанционная передача лабораторной информации** и создание условий для применения принципов и способов лабораторной телемедицины, что может сыграть определенную роль в повышении уровня медицинской помощи жителям отдаленных населенных

Рис. 65. Схема связей в лабораторной информационной системе, объединяющей центральную больничную лабораторию и отдельные пункты выполнения лабораторных анализов в клинических отделениях.

пунктов. При этом предусматривается передача не только цифровых данных о результатах анализов, что можно осуществить с помощью телефакса или электронной почты, но и изображений (например, мазков крови, костного мозга, цитологических препаратов из других биоматериалов), интерпретация которых может потребовать срочного телеконсилиума.

Техническое обеспечение дистанционной лабораторной морфологической диагностики требует наличия роботизированных дистанционно управляемых микроскопов, цифровых фото- или видеокамер, использования различных сетей связи, включая при необходимости спутники, что значительно удорожает этот вариант обеспечения квалифицированной интерпретации лабораторных данных специалистами областного или федерального медицинского центра. Однако в географических и демографических условиях нашей страны внедрение таких систем может иметь жизнеспасающее значение для многих пациентов, живущих вдали от крупных медицинских учреждений. Вместе с тем нельзя рассматривать эту форму интерпретации лабораторных данных как понижение требо-

ваний к уровню квалификации лабораторных работников на местах, поскольку проведение таких телеконсилиумов должно способствовать углублению профессиональных знаний. Кроме того, когда это позволяют темпы протекания патологического процесса у пациента и условия почтовой связи, возможна пересылка мазков биоматериала по почте и проведение необходимых консультаций по телефону.

Перспективы микроминиатюризации лабораторных технологий и оборудования

Идея миниатюризации лабораторных технологий получила весьма перспективное воплощение в виде «лабораторного микрочипа» («микрочипный анализатор», «лаборатория на чипе», « геносенсор», «микрототальная аналитическая система»). Применение этих миниатюрных и микроминиатюрных аналитических устройств позволяет существенно ускорить время аналитических процедур, резко сократить расход биоматериалов, калибраторов и реагентов, максимально стандартизовать аналитику, поскольку сам ход аналитического процесса определяется конструкцией аналитического устройства, а технология производства этих аналитических устройств делает их практически идентичными. Устройства этого типа впервые были созданы в интересах работ по расшифровке генома человека и поиска эффективных лекарственных средств среди сотен вариантов химических соединений близкой структуры. Немаловажное влияние оказали и потребности медицинского обеспечения при космических полетах, при работе в полевых условиях. Основой для разработки и конструирования этих устройств стали материалы и технологии, заимствованные из сферы промышленного производства микроэлектроники.

Для их производства используются силикон, кварц, стекло, пластмассы, а необходимые для проведения аналитических процедур компоненты - каналы, камеры и т.д. -формируются способом фотолитографии или реактивной ионной гравировки. Используется сверление лучом лазера. Особенно малого размера структурные компоненты (порядка 0,1 микрометра) получают методом гравировки рентгеновскими или электронными лучами. Для микрочипных анализаторов уже существует обширное семейство конструктивных элементов, включая фильтры, линзы, насосы, диафрагмы, ион-селективные электроды, фотодиоды, светофильтры и т.д. Типовые размеры микрочипа - 1,5 см х 1,5 см при толщине несколько миллиметров.На рис. 66 представлены общий вид и структура некоторых видов микрочипов.

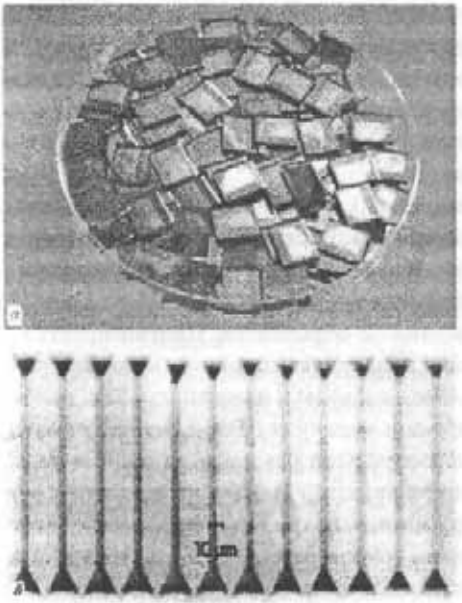


Рис. 66. Внешний вид и структура некоторых микрочипов (по Kricka, Wilding, 1998).

Хотя производство микрочипных аналитических систем находится еще на ранней стадии своего развития, тем не менее уже имеются, например, комбинации камеры для иммуноанализа с устройством для капиллярного электрофореза, микрофильтра для выделения лейкоцитов с камерой для полимеразной цепной реакции. Осуществляется состыковка нескольких индивидуальных микрочипов, предназначенных каждый для отдельной аналитической процедуры, в единый комплекс, представляющий собой многоканальную аналитическую систему, способную одномоментно выполнять несколько видов исследований из одной пробы биоматериала. Фирмой «Randox» (Англия) представлен новый автоматический многоцелевой анализатор Evidence, основанный на технологии биозондов, представляющих собой биосенсоры в качестве детекторов искомых аналитов, а готовые микрочипы (размером 1 см^2) как материальные континуумы для групп биозондов(Multianalyte Biochip Array Technology), что позволяет одномоментно из 1 капли крови выполнять комплекс лабораторных тестов (до 25 аналитов на одном биочипе), характеризующих функцию органа (например, щитовидной железы), вид патологии(например, аллергологические тесты), патологическую форму (например, тройственный тест на

синдром Дауна). При этом упрощается работа, повышается производственная производительность, сокращается общая стоимость теста. Производимые в настоящее время микрочипные анализаторы позволяют осуществлять как считающиеся рутинными процедуры, например, дифференциацию клеток крови, так и самые новейшие методы анализа, например, ДНК-диагностику. Примеры - в таблице 14.

В России разработка микрочипов и их применение для генетических исследований, для ДНК диагностики ведется в некоторых учреждениях Российской Академии Наук, что позволяет ожидать их постепенного внедрения и в клиническую лабораторную аналитику.

Но на этом перспектива развития не обрывается. Прогнозируется в дальнейшем создание наночипов, в качестве компонентов которых предполагается использовать отдельные молекулы и даже атомы. Так, волокно коллагена может служить кабелем, молекула ДНК - ячейкой памяти, белки клеточной мембраны - насосом. Хотя реальных устройств этого типа еще не создано, указывают на примеры самосборки некоторых молекулярных структур, например, липидных трубок диаметром 0,5 микрометра и длиной 30 микрометров; трубок циклических пептидов диаметром 0,7 - 0,8 нанометра. Синтез подобных структур, напоминающих механические устройства, как полагают, может быть средством конструирования наночипов. Некоторые шаги в этом направлении уже сделаны со стороны самих лабораторных технологов. Так, предложенные Cornell et al. иммуносенсоры на основе односайтовой и двусайтовой технологии с использованием ионных каналов клеточной мембраны в качестве рабочего компонента (см . раздел « Основные лабораторные технологии и оборудование») вполне монтируются в будущую наноаналитическую систему. В мировой литературе микро- и нанотехнологии рассматриваются как ведущее направление развития лабораторной техники и технологии для клинических лабораторий в 3-ем тысячелетии. Понятно, что новый уровень размерности микро- и наноаналитических устройств потребует совершенно иной лабораторной инфраструктуры, всей организации и технической оснастки пробоподготовки, что также должно быть глубоко и разносторонне проработано в методическом, организационном и экономическом отношении. Пока же трудно даже представить, какой вид в результате внедрения этих технологий приобретет лаборатория, да и сама наша профессия ...

Таблица 14

Лабораторные исследования с применением микрочипов

Определение газов крови

Газовая хроматография

Капиллярный электрофорез

Масс-спектрометрия с электрораспылением ионов

Исследование клеток:
- выделение
- селекция
- определение подвижности
- обнаружение деформации
- адгезия
- проточная цитометрия

Исследование аминокислот

Исследование ферментов

Определение глюкозы

Определение подвижности сперматозоидов

Электрохемилюминесцентный анализ

Агглютинационный иммуноанализ

Иммуноферментный анализ

Иммуноисследование резонанса поверхностного плазмона

Исследования нуклеиновых кислот:
- гибридизация ДНК
- определение последовательности нуклеотидов
- полимеразная цепная реакция
- множественная ПЦР
- обратно-транскриптазная ПЦР
- лигазная цепная реакция
- анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов

Обнаружение мутаций генов

Принципы выбора и правила использования лабораторного оборудования

Как видно из приведенного очерка видов лабораторного оборудования, имеются устройства, предназначенные как для ручного выполнения лабораторных исследований, так и с той или иной мерой механизации и автоматизации.

Принципы устройства большинства упомянутых приборов приведены, кроме данного раздела, в разделе « Основные аналитические технологии и оборудование» в данном томе, другие описаны в рамках отдельных частных аналитических технологий в последующих томах. Некоторые виды оборудования имеют общее назначение и применимы в лабораториях любого профиля, другие строго специализированы и предназначены для определенного вида исследований, а в ряде случаев - только для исследования определенного аналита. Таким образом, все многообразие современных клинических лабораторных тестов обеспечено соответствующим техническим оборудованием разной степени сложности, причем имеются его варианты, рассчитанные на выполнение: а/ единичных исследований; в том числе вне лаборатории

б/ коротких серий проб биоматериала;

в/ больших массивов проб биоматериала.

Понятно, что выбор того или иного способа выполнения лабораторных исследований должен быть результатом не случайного решения, а плодом тщательной проработки всех аспектов. В приказе МЗ РФ № 380 от 25 декабря 1997 г. по этому поводу рекомендуется предусматривать *внедрение лабораторных технологий на основе рационального сочетания аналитической надежности и клинической целесообразности с учетом экономической эффективности, а выбор форм организации лабораторий осуществлять исходя из оптимального удовлетворения потребностей клинических подразделений с учетом требуемого диапазона тестов, сроков их выполнения и доставки результатов исследований лечащим врачам на основе рационального использования помещений, персонала и оборудования.*

Выбор конкретного набора оборудования для данной лаборатории должен определяться соответствием технико-экономических характеристик приобретаемых приборов с реальными условиями работы лаборатории и потребностями лечебно-диагностического процесса в данном учреждении. Оснащение клинической лаборатории различными устройствами и приборами должно отвечать выполняемым лабораторией ана-

литическим задачам, которые, в основном, вытекают из примерного перечня лабораторных тестов, рекомендованного Министерством здравоохранения РФ для данного типа медицинских учреждений . С этими перечнями соотнесены и примерные перечни лабораторного оборудования, также рекомендованные Министерством здравоохранения РФ (оба перечня приведены в данном томе).

В примерных перечнях оборудования указаны типы приборов, которые рекомендуется иметь в лаборатории данного вида медицинских учреждений. Между тем, рынок лабораторного оборудования в настоящее время весьма широк, и каждому типу приборов может соответствовать большое число моделей, предлагаемых различными производителями. Для принятия решения о приобретении того или иного варианта прибора целесообразно сопоставить их важнейшие свойства. Ориентироваться в разнообразии современного рынка лабораторной техники призваны помочь приведенные выше таблицы характеристик наиболее распространенных видов лабораторных приборов (данные 2000 г.)

Лабораторное оборудование должно обеспечивать правильность и достоверность результатов исследований и безопасность работы лаборатории как для персонала, так и для окружающей среды. Для этого с ним нужно правильно обращаться, своевременно проводить регламентные работы, метрологическую проверку, очистку и дезинфекцию.

В лаборатории должны быть подписанные ответственным лицом и утвержденные администрацией инструкции, отражающие все стороны эксплуатации оборудования, возможные нарушения работы приборов и их проявления: необычный шум, запах, задымление и др., указаны действия персонала в этих случаях, меры безопасности. В инструкции должны быть подробно и ясно описаны все этапы работы на приборе: а/ подготовка - включение в сеть, предварительная настройка, при необходимости - тестирование, калибровка и т.п.; б/ ход рабочих операций - загрузка биологического материала и реактивов, съем и передача информации (в случае измерительного прибора); в/ окончание работы - промывка, дезинфекция, выключение. Если оборудование непрерывно находится в работе (например, термостаты, некоторые автоматические анализаторы), это также указывается в инструкции.

Особый раздел инструкции составляют санитарно-противоэпидемические меры: ежедневная и периодическая очистка и дезинфекция тех частей оборудования, которые соприкасаются или могут соприкасаться с исследуемым материалом (кюветные отделения, роторы центрифуг и др.), спо-

собы обеззараживания стоков и отработанных расходных материалов. Расходные материалы многократного использования (пробирки, пипетки, бюксы, кюветы) стерилизуются после каждого использования, одноразовые - уничтожаются после стерилизации. Описываются меры, проводимые в случае аварийной контаминации исследуемым материалом, например, при разрушении контейнера с пробой или его опрокидывании. Эти предосторожности необходимы, потому что любой исследуемый биоматериал должен рассматриваться как потенциально инфицированный.

Для каждой единицы оборудования или ее вида ведется журнал учета работы, в котором не реже, чем 1 раз в квартал, записываются сведения о наработке (количество часов или дней за квартал), калибровках и юстировках, метрологических проверках. При возникновении неисправностей и других нештатных ситуациях (например, загрязнении в результате попадания биоматериала или реактива в места, где эти вещества не должны контактировать с оборудованием) должны быть сделаны записи о характере происшествия и принятых мерах. Во всех записях указывается должность и фамилия сотрудника, выполнившего соответствующую операцию.

Компьютеры в клинической лаборатории.
Лабораторные информационные системы.

Нельзя не упомянуть и еще об одном важнейшем компоненте современного технического оснащения клинических лабораторий - их компьютеризации.

Широкое и повсеместное распространение персональных электронно-вычислительных машин - персональных компьютеров (PC) не обошло мимо и медицину, в том числе клиническую лабораторную диагностику. Из всех клинических и параклинических дисциплин, медицинская лаборатория по структуре и характеру обрабатываемых данных, оказалась наиболее подготовленной к «сплошной компьютеризации». Причин для этого несколько:

- лаборатория с самого начала оперирует массивами цифровых данных, которые можно непосредственно вводить в компьютер без предварительного кодирования или перешифровки;

- эти данные при любой форме обработки должны быть многократно обсчитаны и переписаны - в лабораторный журнал, на бланк анализа, при выдаче копии, при составлении отчета о работе и т.д. поэтому внедрение вычислительной техники, даже в самом простом варианте, сразу же дает ощутимый эффект;

- лаборатория автономна с точки зрения организации работы: она получает материал для исследования и самостоятельно осуществляет полный цикл его обработки, выдавая готовый результат в виде медицинского документа - оформленного на бланке результата анализа, ее можно компьютеризировать независимо от других подразделений.

Еще в начале восьмидесятых годов компьютер мог быть просто приставкой к лабораторному прибору, которую изготовитель проектировал, применительно к конкретным задачам. Сейчас современный компьютер и информатика - как раздел человеческой культуры, которую они олицетворяют - стали самодовлеющими величинами, которые обросли множеством устройств и понятий, без которых немыслимы. Сейчас невозможно представить себе лабораторную (или какую-либо другую прикладную) программу, которая игнорировала бы понятия «ДОС», «окна», «сети», «диски», «базы данных» и др., поэтому надо обозначить их место в клинической лабораторной практике.

Как конструкция отдельных современных лабораторных приборов ныне не мыслится без оснащения их микропроцессорами для управления их работой, контроля ее качества и обработки результатов, так и деятельность всего лабораторного организма все в большей степени организуется и управляется с помощью компьютеров и их разнообразного программного обеспечения. Упомянутая выше проблема лабораторной интеграции как внутри одной большой лаборатории, так и между отдельными лабораторными подразделениями, не может быть решена без формирования лабораторной информационной системы, т.е. мощного центрального компьютера лаборатории, связанного в единую систему с отдельными приборами внутри самой лаборатории и с примыкающими к ней индивидуальными лабораторными пунктами в клинических отделениях, в операционных, в приемном покое, а при необходимости и с приборами в офисах семейных врачей. Такая система организации связи и взаимодействия на различных лабораторных уровнях послужила основой для возникновения термина «виртуальная лаборатория».

Любой компьютер состоит из центрального процессора и периферии - экрана, клавиатуры, печатающего устройства (принтера), устройства для записи и чтения данных с портативных магнитных носителей - дискеток, устройства для чтения и записи на стационарный магнитный диск (или винчестера, по названию фирмы, где он был разработан) и др. В персональных компьютерах первых поколений на диске можно было хранить несколько миллионов (мега) байт информации (1 байт- это один

печатный знак), в современных- ее объем измеряется миллиардами - гигобайтами. Однако, наибольшая память у оптического диска (по- английски CD-ROM), который в отличие от магнитного является пассивным устройством - персональный компьютер может его читать, но не может на него записывать. Связь с внешними устройствами, в том числе с подключенными к компьютеру гематологическими или биохимическими анализаторами, осуществляется через порты, которые могут быть последовательными - это значит, что информация через них идет относительно медленно, в виде тонкого ручейка - и параллельными, когда она передается сразу пачками. Каждое устройство подсоединяется через отдельный порт. Через эти же порты подсоединяется и «мышь», которая перемещает курсор по экрану, а также модем - для обмена информацией через телефонную сеть с другими компьютерами.

Современные пользовательские программы сделаны так, что они не могут непосредственно управлять работой компьютера и связанных с ним устройств, а делают это через набор специальных программ, которые закладываются в компьютер еще до его продажи и автоматически запускаются при включении электрического питания - так называемой операционной системы или среды. Долгое время у нас была широко распространена дисковая операционная система - ДОС и надстройка к ней - программа Нортон, которая облегчает работу с ДОС. В последние годы все большее распространение получают различные варианты оконной операционной системы (по- английски Windows), внешне она отличается от ДОС тем, что действия производятся с помощью мыши, а информация передается значками.

Персональный компьютер может работать как самостоятельно, так и в содружестве с другими компьютерами, образуя рабочую группу, локальную или общую сеть. С точки зрения пользователя, разница между этими понятиями количественная - речь идет о том, что несколько компьютеров работают как одно целое, в определенные моменты обмениваясь нужной информацией. Машины могут быть соединены между собой специальными проводами, или же через телефонные линии - все зависит от конкретной архитектуры системы. Возможно также подсоединение к глобальной сети - например, «сети сетей» Интернет для передачи результатов клиницистам или контроля качества. В идеальном случае, результаты лабораторного анализа немедленно передаются по сети лечащему врачу, так что между его решением направить биоматериал больного в лабораторию и получением ответа проходит час-полтора.

При работе с компьютером приходится сталкиваться с понятием база данных. Это информация, хранящаяся в памяти компьютера, организованная и систематизированная таким образом, что ее можно легко и быстро извлечь. Клинико-диагностическая лаборатория для успешной работы нуждается в нескольких таких базах данных. Это списки пациентов, с указанием их паспортных данных, а также врачей и лечебных учреждений, которые направляют материал для исследования. Чтобы избежать недоразумений, всякая проба должна быть выверена по ним при регистрации. Отдельная база данных - это выполненные и заархивированные результаты анализов. Очень полезно иметь также базу данных о лекарственной интерференции - не только список лекарств, прием которых делает результаты исследования недостоверными, но кому из пациентов какие лекарства назначены, чтобы в автоматическом режиме привлекать внимание к возможным источникам ошибок. Наконец, отдельная база данных - это результаты контроля качества.

Каждая единица информации, независимо от ее характера, хранящаяся в памяти компьютера, называется файлом. Бывают файлы данных - например, список пациентов или отделений, текстовые - инструкция или отчет или еще какой-либо документ, исполнительные - собственно рабочая программа, например, для управления анализатором.

Не надо смешивать автоматизацию лаборатории с ее компьютеризацией, хотя эти процессы многократно пересекаются. Под автоматизацией обычно понимают замену каких-либо операций, традиционно выполняемых человеком, на автоматические, выполняемые машиной, при этом на выходе оказывается материальный продукт - отмеренная и перелитая в пробирку проба сыворотки, окрашенный мазок, готовый для фотометрии раствор и т.д. Автоматизированный процесс, даже если это окончательный этап анализа, не обязательно заканчивается выдачей полностью обработанных данных - например, автоматический фотометр может выдавать величины оптических плотностей, которые еще надо как-то обсчитывать. Компьютеризация же предполагает замену ручного обсчета и сортировки данных на компьютерный, при этом исходная информация может быть получена ручным методом и введена в компьютер с пульта (клавиатуры).

Соединение возможностей автоматизации и компьютеризации позволяет создать лабораторию - робот, в которой исследуемые пробы движутся по конвейеру, различные автоматы сами отбирают нужные для исследования аликвоты, анализируют их, затем компьютер объединяет

результаты, проверяет их и по электронной связи отсылает лечащим врачам. Современные технические возможности позволяют реализовать эту идею во многих вариантах в соответствии с запросами пользователя. Организация и оборудование такой лаборатории зависит главным образом от готовности к необходимым капиталовложениям и от клинической и экономической оценки целесообразности и эффективности производимых расходов.

Сейчас задача заключается в том, чтобы найти наиболее эффективные пути использования компьютеров в клинической лабораторной диагностике, не ставя под сомнение медицинский характер КДЛ. А это очень существенное обстоятельство - медицинская деятельность не может быть формализована. Как по закону, так и по всеобщему убеждению, лечить может только врач - человек, имеющий специальное образование и опыт работы. Если клиническая лабораторная диагностика является медицинской дисциплиной, то лабораторное заключение (т.е. оформленный на бланке результат анализа)- это медицинский документ, который выдает врач, способный интегрировать полученную в лаборатории информацию со всеми остальными сведениями о пациенте, а также информацией о заболеваемости, доаналитических процедурах и т.д. Компьютер, во всяком случае, на данном этапе развития медицины, эту работу выполнить не может, он может только помочь врачу выполнить ее хорошо и экономно. Этим определяется место информатики в современной клинической лабораторной диагностике.

Формы использования ЭВМ в лаборатории очень варьируют - от относительно небольшого процессора, который работает в составе лабораторного прибора, например, фотометра или счетчика клеток крови, до больших автоматических систем, охватывающих одну или даже несколько клиник, где лаборатория оказывается лишь одним из многих подразделений. Условно можно выделить три уровня компьютерзации клинико-диагностических лабораторий, каждый из которых имеет множество вариантов:

1) Компьютеризация отдельного рабочего места. Первое описание прибора для биохимических исследований с использованием компьютера относится к 1957 году (Skeggs, «AutoAnalyser», «Technicon Instruments»). Прямой интерфейс для ввода данных от прибора в компьютер был впервые реализован фирмой Coulter в счетчике клеток крови. В 1970 г. фирма Du Pont внедрила в практику первый аналитический прибор, в котором все процессы, вплоть до выдачи напечатанного бланка с результатами анализа, управлялись компьютером. Система SMAC

(Sequential Multiple Analysis Computer, «Technicon Instruments») автоматически калибровала каждый процесс исследования, идентифицировала образцы биоматериала, вычисляла и печатала результаты, диагностировала неисправности в работе автоанализатора. Сейчас практически каждый фотометр или анализатор клеточных элементов, не говоря уже о больших автоматах, снабжен встроенным компьютером, который обслуживает прибор, выполняя иногда относительно простые функции - калибровку, расчет концентрации, измерение скорости изменения оптической плотности для кинетических методов и др., иногда и более сложные. По существу, даже использование при подсчете формулы крови электронного счетчика тоже является компьютеризацией рабочего места. Это наиболее простая форма использования компьютера в лаборатории.

2) Компьютеризация работы лаборатории. В этом случае также имеется большой разброс возможностей - компьютер может выполнять только ограниченные функции - например, обрабатывать данные контроля качества, а может организовывать и интегрировать всю аналитическую работу: проводить регистрацию, объединять результаты, выполненные на разных анализаторах, выдавать готовые ответы лечащим врачам, готовить материалы для годового отчета и т.д. Компьютеризация лаборатории может быть осуществлена посредством создания компьютерной сети, когда несколько компьютеров соединены проводами. Но это не обязательно, вся работа лаборатории может быть компьютеризована, даже если имеется только один компьютер или несколько компьютеров, обмен информацией между которыми осуществляется через мягкие носители информации - дискетки.

3) Наивысшая форма - это подключение лаборатории в общую сеть лечебного учреждения или даже комплекса лечебных учреждений.

Первый уровень компьютеризации - это, по-существу, техническая проблема, третий - общемедицинская, хотя и имеет свои лабораторные аспекты. Для клинической лабораторной диагностики специфичен второй уровень - компьютеризация внутрилабораторной работы. Само собой разумеется, что третий уровень не мыслим без второго - чтобы переслать данные в общеклиническую сеть, их надо сначала рассортировать и упаковать в лаборатории.

В любом случае, внутрилабораторная информация должна быть защищена от несанкционированного доступа, что важно не только по соображениям врачебной тайны и медицинской этики, но и потому, что постороннее вмешательство может, без всякого злого умысла, разрушить

всю систему работы компьютеризованной лаборатории. С этой точки зрения лучше, чтобы лабораторная программа была закрытой.

Говоря о компьютеризации, надо различать функциональную схему и ее физическое исполнение. Под функциональной или логической схемой мы понимаем массивы данных, между которыми перемещается информация в процессе работы. Однако, фактические записи, как таковые, могут и не перемещаться, а передаваться только списки адресов соответствующих данных. С точки зрения логики работы, разница между перемещением самих данных или адресов ячеек, в которых эти данные записаны, очень мала, пользователю она может быть и незаметна, однако в некоторых ситуациях различие между программами, написанными по первому или по второму способу, четко проявляется, поэтому надо представлять себе преимущества и неудобства того и другого подходов.

В первом случае, назовем его вариантом физических массивов, при регистрации материала создается временная таблица, строки которой соответствуют пациентам, а столбцы методикам. На пересечении строки пациента и столбца методики делается отметка, указывающая, что исследование назначено. По мере выполнения анализов эти отметки заменяются полученными данными. После окончания работы таблица данных проверяется, результаты оформляются на бланках и переписываются в архив.

В другом случае, назовем его вариантом списков, в базе данных сразу же резервируется окончательное место для данного пациента, куда записываются его паспортные данные и результаты, одновременно создаются списки адресов, указывающие, какому пациенту какой анализ надо сделать и куда его записать.

Первый вариант нагляднее, поэтому в дальнейшем материал будет излагаться так, как будто он единственный, хотя на самом деле это не так. Вариант физических массивов позволяет более экономно использовать ресурсы машины, разделить всю систему передачи информации на небольшие модули, которые удобно переносить с одной машину на другую на мягких носителях (дискетках), программа получается проще и мобильнее. Ее недостаток тот, что надо сразу же ограничить число обследуемых пациентов определенными рамками - например в 120 человек, новую группу пациентов можно начинать обследовать, только когда первые полностью обработаны.

Преимущество второго варианта, когда каждый элемент информации сразу же находит свое место, заключается в том, что возможно организовать ее непрерывное движение и нет нужды специально архивировать ее

данные, поскольку окончательное и постоянное место их хранения сразу же известно. Недостатком этого варианта является потребность в большом ресурсе памяти и «тяжеловесность» архива, который сложно переместить и выборочно очистить, удалив, допустим, данные прошлого года.

Ниже, при рассмотрении различных сторон компьютеризации лабораторий, часто будут употребляться термины «модуль», «раздел программы», «программа». В функциональном отношении это одно и то же, потому что во всех случаях речь идет о структурном элементе, который выполняет какую-то определенную функцию - например, выдает копии анализов. Но он может быть оформлен в виде раздела программы, тогда он запускается из меню этой программы, либо в виде самостоятельной программы, тогда он запускается из общего меню - Нортона, ДОС или Windows. Для последнего случая используется также термин «утилит», обозначающий программу, выполняющую строго ограниченные функции. По ходу изложения, для иллюстрации отдельных возможностей и элементов работы, будут использоваться примеры из написанной автором (И.С.Балаховский) программы «Лика», которая работает в ряде клинико-диагностических лабораторий Москвы. Не должно создаваться впечатления, что это единственное правильное, а тем более возможное решение - на данном этапе компьютеризации лабораторий имеется огромное количество возможных решений, только время и опыт покажут, какие из них лучше.

Специалистов клинической лабораторной диагностики больше всего интересует второй уровень компьютеризации лаборатории, т.е. роль и место компьютера внутри нее. В настоящее время наиболее приемлемой формой компьютеризации лабораторий являются лабораторные информационные системы (ЛИС) различной конфигурации, гибко приспособленные к сфере аналитической деятельности данной лаборатории, ее приборному оснащению и способу организации ее взаимосвязи с потребителями лабораторной информации. Вместе с тем, существует несколько задач, отражающих этапы лабораторной работы, решаемых последовательно в любой лаборатории и поэтому являющихся стандартными функциями ЛИС:

- регистрация поступившего материала,
- назначение исследований и составление рабочих списков,
- собственно выполнение анализов,
- ежедневный контроль качества,
- объединение данных по пациентам,
- валидизация (прием и утверждение) результатов,
- оформление результатов на бланках,

- передача результатов лечащим врачам,
- составление отчета для страховой компании,
- выдача копий анализов (при необходимости),
- внутрилабораторный контроль качества,
- учет количества и качества работы каждого сотрудника,
- учет работы всей лаборатории,
- учет хозяйственной деятельности.

Всякая работа в лаборатории начинается с регистрации поступившего материала и проверки пригодности его для исследования. Очень важно использовать такую систему регистрации, которая исключает путаницу проб. Регистрация проб может осуществляться различными способами: с записью вручную; с использованием наклеек с штриховыми кодами; с использованием магнитных карточек; с использованием специальных держателей пробирок, в которые вмонтированы миниатюрные электронные устройства - носители идентификационной информации.

Если регистрация выполняется вручную, можно использовать систему двойных номеров: один присваивается при взятии пробы в процедурном кабинете или лечебном отделении, а второй непосредственно в лаборатории. Первый условно называется кодом, второй порядковым номером. Каждое лечебное отделение имеет свой диапазон кодов - например, терапевтическое 101-199, а хирургическое 201-299 и т.д. При взятии материала для исследования, он нумеруется подряд в пределах диапазона кодов, закрепленных за данным отделением, причем нумерация переходит от одного дня к другому - если последняя, взятая сегодня проба, имела номер 111, то первой пробе, которую возьмут завтра, будет присвоен номер 112, и т.д. Поскольку диапазон кодов в несколько раз больше количества ежедневно обследуемых пациентов, одинаковые кодовые номера повторяются редко и можно определить, в какой именно день была взята проба с таким-то номером. На любом этапе обработки ежедневного или архивного материала можно по коду установить, откуда поступила проба. Эта информация нужна не только для составления отчета, но и для текущей оценки качества - результат, который у поликлинического больного позволяет заподозрить методическую ошибку, может часто встречаться в отделении реанимации или гемодиализа.

Закрепляя за медицинскими отделениями или учреждениями определенные диапазоны кодов, не надо забывать выделить диапазон и для контрольных материалов, с тем, чтобы при обработке данных их можно было легко дифференцировать.

Помимо кодового, каждая проба имеет еще порядковый номер, который присваивается в лаборатории при регистрации; он нужен для того, чтобы быстро найти требуемый материал. Здесь возможны различные системы нумераций, но предпочтительнее сплошная, когда регистрация не начинается каждый день с первого номера, а продолжаются порядковые номера предыдущего дня до определенного числа, допустим до 1000, после чего нумерация опять начинается с 1. В этом случае, даже если часть работы отложена на следующий день, в лаборатории не может быть одновременно одинаковых номеров. Порядковый номер может быть одним числом или же состоять из двух частей - номера штатива и номера гнезда в штативе, это зависит от того, как хранится материал в данной лаборатории до начала анализа. Важно только, чтобы лаборант мог сразу и безошибочно найти нужную пробу.

Все большее распространение находит использование специальных наклеек с штрих-кодами, содержащими идентификационные номера пациентов (например, № истории болезни), которые считываются в лаборатории специальным устройствами, что позволяет избежать ошибок при ручном вводе. Однако, штрих-код может быть поврежден при транспортировке пробы, поэтому более совершенной считается система, использующая магнитные карточки. В этом случае пробирка с пробой биологического материала помещается в контейнер многоразового использования, в котором укреплена магнитная карточка. Вся необходимая информация - и паспортные данные пациента, и назначения - записывается на нее в отделении, где берут пробу, в лаборатории проверяют пригодность материала для исследования и считывают информацию в компьютер.

Одним из современных вариантов автоматизации процесса идентификации и регистрации проб биоматериала пациентов является система «Clids», разработанная финскими специалистами. Информация о пациенте и назначенных врачом исследованиях вносится персоналом клинического отделения с помощью ручного микрокомпьютерного терминала контактным путем в память миниатюрного электронного устройства («чипа»), вмонтированного в дно пластикового держателя для пробирки с биоматериалом. Одновременно та же информация через имеющуюся в ручном терминале антенну может быть беспроводным путем введена в больничную и лабораторную информационную систему. Содержащаяся в держателе с пробиркой информация считывается лабораторными пробоподготовительными и аналитическими приборами, что позволяет точно выполнить назначения клинициста и безошибочно внести получен-

ные результаты анализов в лабораторную базу данных, а затем в электронную историю болезни соответствующего пациента.

На рисунке 67 изображен вид экрана (окно, интерфейс) лабораторной программы «Лика» во время регистрации. Прежде всего, бросается в глаза «забитость» экрана информацией - усилия приложены к тому, чтобы разместить на нем как можно больше сведений. Это не случайность, а целенаправленная политика. Конечно, все те же сведения можно было бы расположить и на нескольких последовательных экранах, однако, при этом оператору единовременно была бы доступна только часть информации. Заполненный экран представляет собой определенный узор, который опытный работник воспринимает как единое целое, подобно тому, как мы, читая книгу, не разбираем слова по буквам, а видим сразу фрагменты фраз. Это облегчает и ускоряет работу, уменьшая вероятность ошибки. При назначении исследований очень часты повторы, когда разным пациентам назначаются одни и те же анализы. Если на экране приведены одновременно данные нескольких пациентов, такой перенос упрощается, облегчается выявление случайных ошибок.

Экран регистратора имеет несколько функциональных зон. Самая главная из них - ограниченное рамкой пространство, куда заносятся данные текущего пациента - фамилия, № полиса и т.д., а также назначения анализов. Каждая методика обозначена определенной буквой, для опытного работника это очень ускоряет работу, которая напоминает печатание на пишущей машинке. Записи уже зарегистрированных пациентов не исчезают сразу, а поднимаются вверх по экрану, это облегчает копирование назначений. По ходу работы оператор имеет возможность несколько изменять информацию на экране, с тем, чтобы перед глазами всегда было самое важное. Для этого служат кнопки управления в верхней части экрана. В нижней части экрана находится зона подсказки - нажимая клавишу F1 оператор может выводить туда информацию о правилах выполнения работы..

Описанный принцип построения окна лабораторной программы используется и в других ее разделах. Основное положение можно сформулировать так - информация никогда не должна вводиться вслепую, перед глазами оператора, как при вводе данных вручную с пульта, так и с анализатора, всегда должно быть информационное окружение вводимых сведений. В компьютеризованной лаборатории каждый работник перерабатывает огромное количество информации, трудно уследить за возможными ошибками и недоразумениями, логически осмыслить каждую

а

31-12-97 последняя калибровка 10-11-97 A=18.6 B=-0.7
Триглицериды ммоль..л 28.007 1.11-2.28
работает : Проничкина Ирина

измеряется опыт

№ 1	1.92	2.71	2.78	1.74	2.26	4.27	5.42	2.05	1.83
№ 2	0.62	0.83	2.09	4.23	2.04	1.81	1.81	1.05	2.05
№ 3	2.24	3.08	1.35	2.17	2.15	2.54	0.90	0.83	1.87
№ 4	1.79	3.26	2.93	1.13	0.55	1.50	3.19	3.06	1.85
№ 5	1.50	1.42	1.53	1.39	1.50	1.13	1.70	4.97	2.89
№ 6	1.37	1.11	1.03	1.46	1.79	3.52	2.17	0.96	7.59
№ 7	2.97	1.63	2.09	1.79	1.27	0.68	0.75	1.94	1.03
№ 8	3.15	1.22	3.41	0.87	2.22	1.00	1.27	1.96	1.66
№ 9	1.37	1.63	1.61	2.44	3.86	4.01	1.68	-0.08	3.02
№10	0.85	1.01	0.74	2.31	3.24	1.14	2.24	2.43	1.96
№11	1.27	1.22	1.74	1.05	2.63	4.10	2.22	1.63	1.50
№12	0.81	1.53	1.03	1.66	2.26	2.15	2.05	-0.66	-0.64

Esc - прерывание анализа, F10 - окончание работы с записью данных,
F5 - повторное измерение фона, F7 - переключение опыт/фон.

б

Esc - выход, F10 - закрыть таблицу, F9 - записать таблицу, F5 - метка
Insert - копия назначения, Delete - группа, End - вперед, Home - назад

1	51	сливная сыворотка	ЯЧСМИЗОЛЖ
2	7169	КАРАГОДИНА	ЯЧЬИЗОЛ
3	7170	САГАЛОВИЧ	ЯЧИЗЖЬМ
4	7172	ТУЗОВ	ЯЧСРПОЖ
5	7173	ГОЛУБЦОВА	СЗРОЬАБ
6	7173	ОБЫДЕНКОВА	СЗРОЬАБ
7	7174	ВАСИЛЬЕВА	СЗРОЬАБФ
8	214	ЛАЗАРЕВА	АБВЖЩЛЗ
9	215	ОВСЯННИКОВ	АБВЖЩЛЗК
10	31	контроль норма серия 3451	ЯЧСЬИЗОЛЖ

№ - код
11 216 ИВАНОВА
ЯЧСМПРОЛШЩ

группа Ж
паспорт
назначения

ВНИМАТЕЛЬНО ПРОЧТИТЕ ВСЕ ПОДСКАЗКИ, НАЖИМАЯ F1

Назначения фиксируются программой после того, как введен код, присвоенный при взятии крови. Если кода нет или он не известен программе, вся другая информация сохранится, но в рабочих списках его не будет.

В

альб — воспроизводимость									35 - 55 —	
код	207	1331	1334	7257	826	778	823	4260	51	52
n1:	41	45	41	49	43	47	40	39	45	47
n2:	39	37	40	52	42	48	42	52	47	49
n1-n2:	2	8	1	-3	1	-1	-2	-13	-2	-2

Проверка достоверности (P) и воспроизводимости (V%) результатов (F1 справка)

	P	V%		P	V%		P	V%
альб	<0.001	4.4	фосф	>0.5	14.4	Э.Ф.		
белок	>0.5	1.2	жел	<0.001	12.4	Р.Ф.		
бил	<0.001	6.8	Ж.С.	<0.01	9.7	фибр		
АсАТ	>0.5	6.2	ГГТП	>0.5	6.7	калц		
АлАТ	<0.5	5.0	ЛДГ	<0.1	7.0	К		
щф.	<0.1	3.0	БДГ	<0.001	4.5	Na		
М.К.	<0.1	7.7	амил	<0.5	6.2	бетаЛП		
Моч	<0.01	1.4	С.М.					
Хол	<0.001	1.8	СРБ					
Трег	<0.5	2.7	АСЛО					

Рис. 67. а) Вид экрана при регистрации пациентов (программа «Лика»). В верхней части рисунка информация о функциональных кнопках, ниже уже зарегистрированные пациенты (в том числе сливная сыворотка, которая анализируется как проба пациента). В начале каждой строки порядковый номер, он состоит из № штатива и № гнезда в штативе, затем кодовый номер пациента, дальше фамилия, в конце строки буквы, означающие, какие исследования надо выполнить. Очередной пациент записывается в двойной рамке, еще ниже подсказки.

б) Вид экрана на этапе ввода данных. На экране перечень методик, перед каждым сокращенным названием дата, когда было последнее изменение параметров, затем буква, используемая в качестве символа методики. Дальше идут служебные символы, число назначенных исследований, R -анализ выполнен, ? - назначен, но не выполнен, в конце строки № лаборанта. Внизу экрана времена начала и конца разных этапов работы.

в) Вид экрана при ежедневной проверке качества, P - это вероятность того, что сегодняшние данные есть случайная выборка из ранее накопленных результатов, эта запись расшифровывается вверху экрана, V% - индекс, аналогичный коэффициенту вариации.

цифру . При ручной работе лаборант имеет в своем распоряжении много неформальной информации (цвет пробы, ее мутность и т.д.), которая позволяет контролировать ход работы. Для компьютера эта информация не существует, а человек не успевает уследить за ней. Поэтому очень важно не сосредоточиваться на конкретной цифре, а сразу видеть, по-

возможности, весь массив данных, касающихся пациента или методики. Это позволяет если не полностью исключить, то уменьшить вероятность ошибок и несуразностей.

Другой важный принцип - никакая работа не должна проводиться анонимно. Введение или удаление любых сведений может проводиться только конкретным работником, который «расписывается» за них, вводя свой код. Соответственно, существует иерархия кодов, точнее их владельцев - чем выше положение в этой иерархии, тем больше прав. Самые высокие права у руководителя работы - того, чьей фамилией подписывается оформленный на бланке анализ, который выдается в клинику. Тем самым, работа всегда персонифицирована. Изменить имя руководителя работы нельзя, можно только сделать новый экземпляр программы, в котором будет новый руководитель. Такая жесткая постановка вопроса - необходимое условие ответственности и связанного с ней авторитета лаборатории. Правда, есть определенные исключения, которые нисколько не ослабляют правило. Чтобы понять их существо надо затронуть способ фиксирования данных в памяти компьютера.

Существует много видов электронной памяти, но нас сейчас интересуют две: - оперативная и постоянная. Непрерывно работает - общается с оператором, анализатором, печатающим устройством - оперативная память, но когда машина выключается, все ее сведения теряются. Поэтому для длительного хранения используется постоянная память - запись на жесткий диск, так называемый винчестер. Перед каждым сеансом программа считывает всю необходимую информацию с жесткого диска, после чего готова к работе.

Лабораторная программа должна иметь два типа ограничений к доступу информации - либо, не введя код, вообще нельзя войти в соответствующий раздел, либо можно туда войти, посмотреть все сведения и даже изменить их, но нельзя записать в постоянную память, поэтому эти сведения будут существовать только во время данного сеанса работы. Этот двойной стандарт даст возможность работникам в некоторых случаях посмотреть «чужие данные», которые могут быть нужны, чтобы ориентироваться в чем-то или сравнить новые результаты с полученными ранее. При коллективной работе абсолютный запрет нерационален, но обезличка также недопустима.

Любая программа, под управлением которой работает клинико-диагностическая лаборатория, всегда состоит из трех разделов или блоков, как бы они ни были оформлены. Это подготовительный раздел, испол-

нительный и отчетный. Подготовительный отдел или блок служит для того, чтобы ввести в компьютер все нужные для работы исходные данные: названия методик, нормы (справочные или референтные величины), информацию о том, кому какую работу разрешается делать, название лаборатории и лечебных отделений и т.д. К исполнительному блоку относятся те разделы, которые непосредственно обеспечивают работу: регистрация, ввод данных с анализаторов или с клавиатуры, распечатка результатов на бланках. В третьем отделе сосредоточено все, что нужно для того, чтобы лаборатория могла отчитаться о своей работе и, в случае необходимости, выдать копию анализа. Это и отчет для страховой компании, и работа лаборантов, и контроль качества, и учет по лечебным отделениям, и расход реактивов, их стоимость и т.д..

К первому - подготовительному блоку- и к третьему - отчетному- нет необходимости ежедневно обращаться, практически работает с ними только руководитель работы, исполнительный же блок ежедневно используется всеми сотрудниками. Такова функциональная структура программы с точки зрения внешнего наблюдателя. А с точки зрения взаимодействия различных ее частей надо выделить ядро и периферию. Ядро лабораторной программы - это те модули, которые выполняют ее главные функции - регистрацию, ввод данных, ежедневный контроль качества, оформление результатов на бланках, ведение архива. Они существуют при всех обстоятельствах, без них работа невозможна. Периферию же составляют вспомогательные модули, которые в каких-то вариантах нужны, в каких-то нет. Так, модули, которые вводят названия лечебных отделений и фамилии работников, нужны только в больших лабораториях, а в маленьких, где только один врач и один лаборант, они не нужны. То же касается модулей или, как говорят, утилит (выполняющих одну узкую функцию), обеспечивающих составление отчетности, они не могут быть универсальными, поскольку в разных типах лабораторий существуют разные требования к отчетности. То же касается связи с автоматическими анализаторами - каждый из них требует специальной утилиты или интерфейса - блока, который читает информацию в том виде, в котором выдает ее анализатор, и переводит в форму, понятную лабораторной программе. На рисунке 68 приведена общая блок-схема лабораторной программы. На ней выделены модули, составляющие подготовительный, исполнительный и отчетный блоки, а также ядро программы.

Все, о чем шла до сих пор речь, касалось автономной работы лабораторной программы - того, что она делает внутри лаборатории. Есть еще и

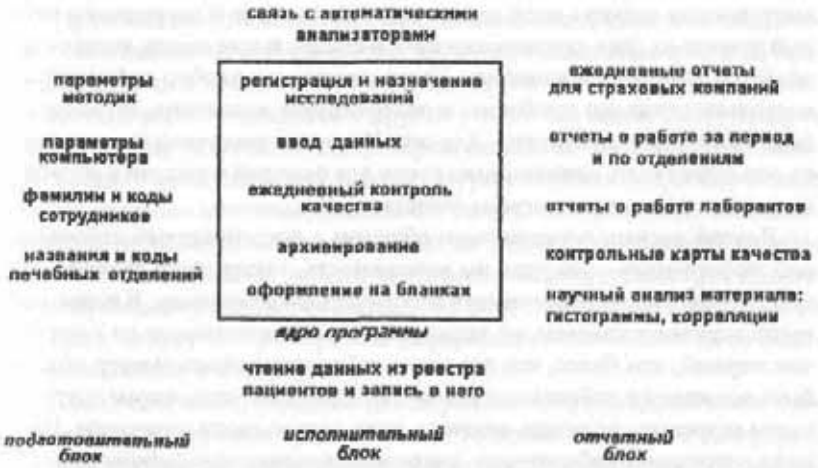


Рис. 68. Блок-схема лабораторной компьютерной программы.

другая сторона ее деятельности, то что было названо третьим уровнем - связь с внешним миром. Этот внешний мир бывает очень различен - им может быть медицинская компьютерная сеть лечебного учреждения (или целого клинического городка), общественная компьютерная сеть типа Интернет. Иногда внутрибольничную компьютерную сеть делают так, что компьютера, как такового, в лаборатории нет, а есть только терминал, «завязанный» на центральный компьютер. Это неудачное решение, поскольку новый анализатор, изменение функциональных обязанностей, совершенствование контроля качества или даже перемещение аппаратуры из одного помещения в другое требуют согласования с общей сетью, во время которого могут возникнуть самые неожиданные трудности.

Многие проблемы упрощаются, если лабораторный компьютер подключен в общую сеть типа Интернет. Технически это осуществляется через специальное устройство - модем, который соединяет компьютер с телефонной линией. Одна из функций сети Интернет - это электронная почта, которая позволяет передавать информацию в виде электронных писем по определенным адресам. Потребители информации - лечащие врачи или лечебные отделения - должны быть также абонентами этой сети. После того, как анализ выполнен и подписан, в электронной форме он пересылается на центральную станцию, где хранится до тех пор, пока адресат (т.е. лечащий врач) сам его не затребует. Таким образом, сеть

выступает не только в роли разносчика анализов, но и посредника, который хранит их, для каждого адресата в специальном месте, которое называется «почтовым ящиком». Такое положение удобно лаборатории, поскольку отпадают проблемы с потерянными анализами, по которым надо выписывать дубликаты. Для сети Интернет расстояний не существует, она может быть использована также для быстрой передачи и обработки данных внешнего контроля качества.

Другой вариант электронного общения с потребителями лабораторной информации - это дать им возможность, также через телефонную сеть, входить непосредственно в лабораторный компьютер. В принципе, такой вариант возможен, но технически и организационно он сложнее, чем первый, тем более, что для этого лабораторный компьютер должен быть все время в рабочем состоянии. Вряд ли есть смысл всем потребителям разрешать получать анализы, даже только своих пациентов. Иное дело, сотрудники лаборатории, например, руководитель работы или консультант, которые могут получить возможность управлять работой, находясь вне стен лаборатории. В литературе обсуждается такая схема работы, когда ответственный за передачу анализов клиницистам проверяет и подписывает их со своего домашнего или портативного компьютера.

Если же лабораторный компьютер не подключен в сеть, остается возможность работать по-старому - оформлять анализы на бланках и разносить по отделениям. Это, безусловно, плохо - и трудоемко, и трудно контролировать движение информации - анализы теряют, путают, они запаздывают.

Общение лаборатории через компьютер с внешним миром требует совместимости формы представления данных. Дело в том, что существует много разных способов записать одну и ту же информацию, например число, в память ЭВМ. Форма, в которой эта запись делается, называется форматом. Например, число 4 можно записать словом «четыре», можно записать цифру «4», можно записать как 2 во 2 степени, можно рядом с ним оставить место для десятичных долей, которое в случае целого числа будет занято нулями и т.д. Есть очень экономные способы записи, которые занимают мало места, они пригодны только для специальных случаев, например, когда заранее известно, что число положительное. Есть расточительные, зато универсальные способы, когда записывается не только само число, но и информация о том, каким шрифтом оно должно быть напечатано. Поэтому между той программой, которая передает информацию, и той, которая ее получает, должна быть договоренность о формате данных.

Применительно к интересам медицины вообще, и клинико-диагностических лабораторий,в частности, это очень большой и серьезный вопрос, требующий специального обсуждения на международном уровне. Допустим, пациент оказался в другой стране. На каком языке следует направить ему результаты лабораторного анализа? В принципе возможно создание международной номенклатуры исследований, когда не надо писать название методики, достаточно указать ее номер (код) по классификации, и любая национальная ЭВМ автоматически распечатает текст анализа на своем языке, хотя с самого начала анализ существует, хранится и передается в виде международного кода. Это не только удобно, но и выгодно, потому что при передаче информации оплачивается не ее смысловое значение, а число знаков.

Пока такой международной договоренности нет, разумнее всего в лабораторной программе представлять и упаковывать числа в той форме, которая удобнее всего разработчику программы, не забывая, что для общения с внешним миром, в частности, со страховыми компаниями, должны существовать специальные модули, осуществляющие связь с ними. Оформленные на бланках анализов, которые выдаются лечащим врачам, результаты исследований должны быть представлены в виде текста на русском языке, а в электронном форме могут существовать в виде так называемого текстового файла.

***

Таковы общие принципы использования компьютеров в клинико-диагностических лабораториях, которые в разных программах могут быть реализованы по-разному. Для иллюстрации одной из возможностей рассмотрим написанную нами (И.С.Балаховский) **программу «Лика»**, которая уже несколько лет работает в ряде лабораторий Москвы. В ней движение информации реализуется по принципу физических массивов, что делает ее более компактной и пригодной для использования на самых простых и дешевых компьютерах.

Программа позволяет обрабатывать данные до 128 различных методик, одни и те же данные могут быть выведены на экран в двух вариантах - клиническом и биохимическом, первый вариант удобнее для общеклинических лабораторий, второй для биохимических. Различие заключается в том, что в первом случае вид экрана напоминает бланк анализа - под фамилией пациента на нем перечислены методики, данные которых вводятся. Во втором случае в основу взята методика, на экране перечень пациентов, против фамилии каждого стоят результаты нескольких ис-

следований. Программа в основном варианте предусматривает использование русского языка, однако все надписи на экране вынесены в отдельный файл, поэтому их можно перевести на любой язык, не затрагивая существо программы.

В подготовительном разделе программы предусмотрен модуль для ввода названий клинических отделений (или обслуживаемых учреждений), их может быть до 125. Руководитель работы по своему усмотрению закрепляет за каждым из них определенный диапазон четырехзначных кодовых номеров от 101 до 9999, номера меньше 100 закрепляются за контрольными материалами. Обычно каждому отделению выделяется по 99 номеров - например от 101 до 199 или от 501 до 599 и т.д. Таким образом, первые две цифры - это номер отделения, вторые две- порядковый номер внутри отделения.

Следующий раздел подготовительного модуля - список лаборантов. Записывая в него фамилию, руководитель работы одновременно присваивает пароль, который используется для доступа к программе. Пароль (код) на экране виден только один раз, когда он вносится, его надо сразу же запомнить. Изменить пароль или записать нового сотрудника может только руководитель работы, который закрепляет свое решение собственным кодом, прочесть же фамилии лаборантов может каждый. Всего может быть записано до 48 фамилий, что позволяет не вычеркивать сотрудников, которые перешли на другую работу. Программа, фиксируя кто выполнил данную методику, записывает порядковый номер в списке, поэтому если сначала он был присвоен одному работнику, а затем другому, может возникнуть путаница, кто именно сделал исследование, выполненное некоторое время назад.

Самый важный модуль в подготовительном разделе- это ввод параметров методик. Он состоит из нескольких страниц (последовательно сменяющих один другой экранов), с помощью которых вводится полное название методики в том виде, в каком оно будет напечатано на бланке готового анализа, ее сокращенное название, которое используется программой по ходу работы, а также буква, которую используют, чтобы назначить исследование. Для каждого метода указывается также его код для страховой компании, формат (сколько знаков после запятой), диапазон нормальных величин и диапазон допуска, т.е. диапазон значений, которые вообще могут быть. Если результат выходит из этого диапазона, он сохраняется в программе со специальным знаком, но лечащему врачу не выдается. Это позволяет исключить недоразумения, вызванные техническими ошибками. Программа предусматривает общие референтные пределы и по группам - например, для мужчин, для женщин, для отделения реанимации. Та-

ких групп может быть 4; если при регистрации указывается, к какой группе относится пациент, на бланк выводятся его групповые референтные пределы, если не указывается, приводятся общие пределы. Применительно к каждой методике указывается способ ее выполнения - ввод результата вручную или автоматический с анализатора, а также сведения, необходимые для того, чтобы анализатор и программа «поняли» друг друга. Указывается и способ назначения анализов - он может назначаться всем пациентам или выборочно, или в зависимости от результата другого исследования - например, прямой билирубин делается только тем, у кого общий повышен. Вводятся также сведения о стоимости анализа и значениях, которые должны получиться в контрольных материалах.

Программа позволяет вводить в бланк расчетные показатели –например, глобулин-альбуминовый коэффициент или цветной показатель, который вычисляется автоматически, когда исходные методики уже выполнены. Руководитель работы может сам придумать новый расчетный показатель, и записать в программу формулу, по которой должно быть проведено вычисление.

К подготовительному разделу относится также таблица руководителя - раздел программы, посредством которого можно выбрать цвет для экрана, указать сколько и каких контрольных материалов надо исследовать, выбрать алфавит и последовательность распечатки методик на бланке. Все это делает программу гибкой, позволяя руководителю работы придать ей нужную форму.

Важный элемент подготовительного раздела - подробная инструкция о работе и описание составляющих программу файлов, а также справочник по методам, который руководитель работы составляет и редактирует по своему усмотрению.

Исполнительный раздел программы « Лика» состоит из трех основных модулей: регистрации, ввода данных и оформления результатов на бланках. Кроме того, для каждого автоматического анализатора, которым оснащена лаборатория, имеются отдельные программы или модули в общих программах, которые обеспечивают связь с ними. Вопрос о том, что лучше - специальная программа или же отдельный модуль- решается индивидуально, и тот, и другой вариант имеют свои преимущества и неудобства. Многое зависит и от конструкции анализатора - может ли он только передавать данные, или же также воспринимать из внешнего компьютера рабочие списки и другие параметры работы. Отдельная программа удобнее в том отношении, что ее можно поставить вместе с анализа-

тором, не затрагивая налаженную уже работу по регистрации, распечатке результатов и т.д., но это дополнительная нагрузка на оператора.

О модуле регистрации уже было сказано. Надо добавить, что программа «Лика» построена с использованием физических массивов данных. Это значит, что ежедневно создается временная таблица, куда записываются демографические данные пациентов и полученные в этот день результаты. Перед началом регистрации старая таблица стирается и на ее месте создается то, что бухгалтеры называют «пустографкой», т.е. бланк для записи информации о пациентах и назначениях анализов. В этом бланке уже проставлены порядковые номер проб и указано место для контрольных материалов. Оператор вводит нужные сведения, непротиворечивость которых программа проверяет - например, нельзя назначить непредусмотренную программой методику. В такой рабочей таблице может быть записано до 120 пациентов, включая контрольные материалы. Когда регистрация закончена, программа методом случайных чисел назначает повторные исследования каким-либо 8 пациентам, эти дубли будут использованы для контроля качества. Одновременно вводится информация о дефектах при взятии материала -гемолиз, хилез, мало сыворотки и т.п.

После окончания регистрации таблица закрывается, в этот момент назначаются повторные исследования и составляются рабочие списки - в каких пробах нужно делать те или иные исследования. Одновременно готовится материал в виде файлов, которые нужны для связи с внешними анализаторами.

Следующий этап - аналитический процесс. Если он выполняется анализатором, который может воспринимать внешнюю информацию и нуждается в ней, рабочий список (в какой пробе какие анализы сделать) передается туда в виде файла, в противном случае лаборант вынужден программировать работу (т.е. указывать, в какой пробе какие исследования нужно сделать) непосредственно с пульта анализатора. Результаты выполненных на анализаторе исследований передаются в программу либо по проводам (если анализатор соединен «в линию»), либо на мягком носителе (дискетке). Разумеется, для того, чтобы данные анализатора были понятны основной лабораторной программе, они должна быть определенным образом переписаны специальным программным модулем, который обозначен на схеме как «связь с анализатором». Имеется множество вариантов, избираемых применительно к каждому конкретному случаю.

Поступившие с анализаторов или введенные вручную с пульта, результаты записываются в ту же временную таблицу, которая была приготовле-

на при регистрации. Программа предусматривает использование нескольких вариантов методов контроля качества. Это, во-первых, сравнение результатов разных методик - например, креатинина и мочевины или АсАТ и АлАТ, которые обычно в известной мере коррелируют между собой. Несоответствие сразу же обращает на себя внимание, поскольку при выводе на экран патологические результаты высвечиваются другим цветом. На экран также выводятся результаты повторных исследований одного и того же материала, как контрольного, так и повторных исследований одних и тех же пациентов. Степень совпадения результатов параллельных исследований оценивается индексом по типу коэффициента вариации. Есть также возможность вывести на экран в виде графика результаты исследования контрольного материала на протяжении последних 20 рабочих дней, с тем, чтобы можно было оценить их динамику. Если в этот день было выполнено больше 30 исследований данного вида, то используется еще один путь контроля качества - сравнение характера распределения результатов, полученных сегодня, с тем, что было раньше. Он основан на предположении, что если обследуется один и тот же контингент больных, то различия между гистограммами распределения результатов носят случайный характер и их вероятность можно оценить методом хи-квадрат. Если вероятность того, что сегодняшние результаты являются случайной выборкой из полученных ранее, составляет менее 0,01, следует искать причину - изменился ли контингент обследуемых или же допущена методическая ошибка. (Подробнее см. в разделе «Статистические методы»).

Как уже отмечалось, результаты можно вводить в двух вариантах - по методикам и по пациентам. В первом случае результаты одного метода вводятся сразу всем пациентам (это облегчает контроль качества), во втором - каждому пациенту вводятся все полученные для него результаты, что позволяет лучше оценить их клиническое значение. Работник в любой момент может переключиться с одной системы на другую.

После того, как результаты введены и проверены, таблица закрывается и принимается - при этом данные архивируются и становятся доступными для распечатки на бланках. Тот, кто принимает таблицу, вводит свой код, который фиксируется программой, в дальнейшем никакие изменения результатов анализов невозможны. Принятие таблицы в данном случае тоже имеет значение, которое в ряде стран обозначается термином «валидизация», т.е. придание ценности. Пока анализ только выполняется, он еще не имеет ценности, это только проект. Медицинским документом он становится только после того, как принят и подписан, т.е. валиди-

зирован. В программе «Лика» можно сразу валидизировать целый массив данных, или же принимать каждый анализ в отдельности. Первый путь оправдан в том случае, когда контрольные материалы у всего массива едины - если их результаты соответствуют требуемым, значит вся серия в аналитическом отношении надежна.

Отчетный раздел дает работникам лаборатории возможность с самых разных точек зрения познакомиться с накопленным материалом. Наиболее оперативная его часть - это составление отчета для страховой компании, который составляется ежедневно . В нем указывается, какие исследования были сделаны каждому пациенту, и общее число выполненных в этот день анализов.

Сюда же относится программный модуль, который при необходимости выдает копии анализов.

Предусмотрена возможность составления рабочего отчета за любой промежуток времени - сколько каких исследований было сделано для отдельного подразделения или же любой их группы. Составляется также отчет о работе лаборантов по дням и за любой период, причем в ежедневных отчетах указывается не только число выполненных исследований, но и их качество.

Материал может быть обработан и в научном отношении - построены гистограммы распределения результатов для любой комбинации рабочих дней и лечебных отделений, а также корреляции между результатами двух методик. Это позволяет использовать программу не только для выполнения ежедневной работы, но и анализа результатов - например, решения вопроса о том, насколько информативна та или иная методика для данной группы пациентов.

Эффективность использования компьютеров в клинико- диагностических лабораториях не вызывает сомнений - в целом, это экономия 30-40% рабочего времени, не говоря уже об исключении самой возможности случайных ошибок при переписывании информации. Однако, формы их использования еще далеко не устоялись, поэтому нельзя даже ставить вопрос о какой-то унификации подходов, тем более их регламентировании. По этому поводу надо заметить, что компьютерные программы для клинико-диагностических лабораторий, во всяком случае в том виде, в каком они описаны, не являются медицинскими программами, поскольку не выносят каких-либо рекомендаций, суждений или оценок. Они только обрабатывают цифровой материал, который в отсутствии программ обсчитывался бы вручную, т. е. выполняют ту же функцию, которую раньше выполняли конторские счеты или калькуляторы.

Система автоматизации лабораторных исследований ALTEY Laboratory

В качестве примера системного решения проблемы информатизации клинической лаборатории в рамках медицинского учреждения приводим предлагаемую Научно-производственным объединением «АЛТЕЙ» систему автоматизации лабораторных исследований ALTEY Laboratory.

Система ALTEY Laboratory обеспечивает:

- ведение реестра пациентов;
- прием направлений на анализы из лечебных отделений по компьютерной сети, из других лечебных учреждений по электронной почте или ввод назначений на исследования непосредственно в лаборатории;
- формирование списков направлений для лаборантов, производящих сбор проб биоматериалов;
- интеграцию в информационную систему лаборатории современных лабораторных анализаторов и систем пробоподготовки, включая передачу рабочих листов, получение результатов, обнаружение ошибочных исходных данных и др.;
- автоматическую проверку на соответствие результатов анализов нормам для различных категорий пациентов;
- передачу результатов анализов в единую базу данных лечебного учреждения по компьютерной сети и в другие лечебные учреждения по электронной почте;
- вывод на печать результатов анализов в лаборатории и отделениях лечебного учреждения;
- ведение внутренней и внешней отчетности лаборатории, включая карты наблюдения пациентов, журналы регистрации исследований, подготовку периодических статистических отчетов лабораторного отделения;
- возможность для лечащих врачей анализировать динамику показателей состояния пациента на своем рабочем месте в табличной и графической форме;
- ведение архива лабораторных исследований;
- учет стоимости произведенных исследований, передачу в систему обязательного медицинского страхования (ОМС) сведений о медицинских услугах, оказанных лабораторным отделением.

Описание функционирования системы ALTEY Laboratory:

Заказ лабораторного исследования

Для передачи направлений на лабораторные исследования из отделений и других лечебных учреждений устанавливается специализированное программное обеспечение. С его помощью лечащий врач или медсестра, создавая направление, выбирает фамилию пациента из реестра пациентов, лабораторию, профиль исследования, производимого данной лабораторией, тесты из числа тестов, предусмотренных профилем, устанавливает дату и время, когда следует провести исследования. Предусмотрена возможность сопроводить направление комментарием, позволяющим врачу пояснить цели исследования с учетом особенностей протекания болезни, проводимой терапии и др. и, таким образом, получить наиболее адекватные результаты. Система автоматически фиксирует время создания направления и фамилию автора, что облегчает установление контакта с ним, если лаборанту необходима дополнительная информация.

Система сохраняет направления в базе данных, отображает их список на экране и ожидает поступления результатов анализов. Направления, по которым получены результаты, помечаются в списке как выполненные. За счет оптимальной организации ввода, создание и передача по компьютерной сети одного направления занимает несколько секунд .

Сбор биоматериала

Системой предусмотрено два варианта организации регистрации биоматериалов: регистрация биоматериалов, поступивших вместе с направлениями, и сбор биоматериалов лаборантами согласно списку направлений. В первом случае нумерация биоматериалов проводится в порядке ввода информации о соответствующем направлении. Во втором - системой автоматически формируются и выводятся на печать списки направлений с указанием фамилий пациентов, номеров палат, типов материалов, которые следует собрать и номеров, которые следует проставить на пробирках. Руководствуясь списками, лаборанты производят сбор биоматериалов в отделениях.

Проведение исследований

Порядок проведения исследований, при работе с системой, выбирается в зависимости от устоявшейся в медучреждении технологии работы с анализами и технических возможностей, применяемых в данной лаборатории анализаторов и систем пробоподготовки. Система поддерживает однонаправленный и двунаправленный обмен данными с анализато-

рами, позволяет управлять автоматическими и полуавтоматическими анализаторами, обеспечивает ручной ввод результатов неавтоматизированных исследований. Приведем несколько примеров.

При проведении неавтоматизированных исследований, например, подсчета клеток крови под микроскопом, система предоставляет возможность ручного ввода результатов анализа. При этом в зависимости от профиля исследования, лаборанту автоматически предоставляется «рабочий стол» ввода информации по данному профилю. В частности, на «рабочем столе» могут отображаться расчетные индексы и другая полезная информация. Возможна работа в режиме эмуляции счетчиков на компьютерной клавиатуре.

Однонаправленные анализаторы, например, клинические анализаторы крови с фиксированным набором параметров типа Sysmex F-800 или Coulter MD-18, не имеют технической возможности непосредственного приема заказов (так называемого рабочего листа) от компьютера. Соответственно, возникает проблема сопоставления направлений и результатов. В данном случае используется предусмотренная производителями подобных анализаторов возможность ввода с пульта прибора номера пробы. Результаты, передаваемые прибором на компьютер, приписываются к номеру пробы. Чтобы номера направлений и результатов совпадали, требуется соблюдать очередность проведения измерений. В простейшем случае в качестве однонаправленного анализатора может выступать электронный счетчик, имеющий выход на компьютер. Нумерованные результаты исследований автоматически или по запросу лаборанта передаются с анализатора на компьютер лаборанта для дальнейшей обработки.

Современные анализаторы, например биохимический анализатор крови Express 560 («Chiron Diagnostics») обладают возможностью получать рабочий лист непосредственно от компьютера. Таким образом, проблемы сопоставления номеров результатов с номерами направлений просто не возникает. Система автоматически формирует рабочий лист, учитывая нумерацию направлений, а принимая результаты, автоматически сопоставляет их соответствующим направлениям. Прибор получает непосредственно с компьютера информацию о заказе на исследования с перечнем всех тестов, затребованных врачом. Здесь существенно экономится время, резко снижается возможность возникновения ошибок при вводе данных. Таким образом, при наличии полного автомата, подключенного к компьютерной системе ALTEY Laboratory, рутинная работа лаборанта сводится к тому, чтобы разместить кюветы

в барабане или планшете анализатора согласно листу размещения, определяемому системой (в простейшем случае - размещение в порядке нумерации кювет).

При использовании роботизированной системы пробоподготовки, например MultiProbe II производства фирмы «Canberra Packard» рутинная работа сводится к минимуму. Сформированный в системе ALTEY Laboratory рабочий лист передается системе пробоподготовки, которая автоматически размещает пробы на планшетах для проведения различных видов тестов и далее передает управляющую информацию (runlist) на анализатор, а тот, в свою очередь, передает результаты обратно в систему ALTEY Laboratory.

Система ALTEY Laboratory позволяет организовать эффективную циркуляцию лабораторной информации для самых различных технологий проведения исследований: от ручных методов до роботизированных, а также для их всевозможных комбинаций.

Система ALTEY Laboratory, позволяет распределять выполнение тестов одного профиля между несколькими анализаторами и/или ручными методами и, таким образом, задействовать при выполнении одного направления все аналитические возможности лаборатории. Появляется реальная возможность перехода от инструментальных профилей, ограниченных возможностями анализатора или ручного метода исследования, к системным профилям, ориентированным на конкретные диагностические задачи: обследование органа, системы, обоснование диагноза и т.д.

Обработка результатов исследований

Система ALTEY Laboratory позволяет хранить и обрабатывать такие виды результатов лабораторных исследований, как

- числовые значения;
- лингвистические значения;
- распределения, задаваемые гистограммами;
- сообщения анализаторов о корректности передаваемых данных.

Обработка результатов исследований при использовании системы ALTEY Laboratory проводится с целью подготовки и принятия врачом лаборатории решения о том, что цели заказанного исследования достигнуты, результаты безошибочны и могут быть переданы лечащему врачу.

Подготовка этого решения содержит следующие основные операции: ознакомление лабораторного специалиста с результатами тестов, коррекцию ошибок, сопоставление результатов с нормами соответствующей категории пациентов, диагнозом, стадией и т.п., при необходимости, ком-

ментирование результатов. Система обеспечивает информационную поддержку этих операций следующим образом.

Лабораторному специалисту предоставляется возможность быстрого просмотра результатов исследований. При этом система акцентирует внимание на обнаруженных ею ошибках. Для каждого полученного значения выводятся сообщения анализаторов о корректности. Результаты измерений автоматически анализируются системой на соответствие нормам данной категории пациентов и предельно допустимым диапазонам. Лабораторный специалист знакомится с предварительно обработанными данными, снабженными комментариями, нормами, цветовой индикацией, первичной лингвистической интерпретацией. Помимо этого, при рассмотрении конкретного лабораторного исследования имеется возможность оперативно обратиться к аннотированной справочной информации о данном виде лабораторных исследований.

Для устранения выявленных ошибок, по запросу лабораторного специалиста система автоматически формирует рабочий лист и проводит повторные измерения.

Признанные безошибочными и, при необходимости, снабженные комментарием лабораторного специалиста, данные сохраняются системой в электронной истории болезни и с этого момента становятся доступными лечащему врачу. Имеется возможность сохранять данные по частям: результаты быстро выполняемых тестов могут использоваться врачами, в то время как результаты длительных тестов еще не готовы. Таким образом, результаты по отдельным тестам профиля могут становиться доступными врачам по мере их выполнения лабораторией.

Ознакомление лечащих врачей с результатами исследований

Результаты лабораторных исследований в системе ALTEY Laboratory могут быть представлены:

- на традиционном бланке с указанием норм, с дополнительными возможностями цветового выделения результатов и гистограммами;
- в виде анализа с предысторией, когда помимо результатов по текущему направлению на бланке присутствуют несколько предшествующих результатов для оценки краткосрочной динамики;
- в виде карты наблюдения, на которую выводятся все результаты анализов за указанный временной период;
- в виде синхронизированных во времени графиков изменения нескольких параметров, выбранных врачом для анализа динамики состояния пациента.

Для определения набора параметров, необходимых при анализе динамики состояния пациента, врач может воспользоваться одним из профилей направлений или же создать собственную форму просмотра результатов исследований с учетом особенностей конкретного заболевания.

Интеграция с системами ОМС, ДМС и другими медицинскими информационными системами

Система ALTEY Laboratory предоставляет информацию о медицинских услугах, оказанных лабораторным отделением по системам ОМС, ДМС. Данные о медицинских услугах могут быть получены в электронном виде на дискете или по компьютерной сети в формате информационных систем учета стоимости медицинских услуг, поставляемых ведущими медицинскими страховыми компаниями.

Система ALTEY Laboratory имеет возможности интеграции с другими медицинскими информационными системами. Например, в Гематологическом научном центре РАМН проведена интеграция с системой учета пациентов ГНЦ РАМН.

Адаптация системы

Адаптация системы ALTEY Laboratory к особенностям работы конкретной клинической, биохимической и т.д. лаборатории сводится к тому, чтобы:

- учесть особенности сложившегося порядка проведения лабораторных исследований;
- настроить базу нормативно-справочной информации;
- подключить к компьютерам анализаторы и системы пробоподготовки.

Учет особенностей сложившегося порядка проведения лабораторных исследований происходит путем определения вариантов комплектации рабочих мест лаборантов специализированными программными модулями, проведения глобальной настройки системы, а также локальных настроек программного обеспечения рабочих мест.

Для настройки базы нормативно-справочной информации, включающей виды тестов, нормы, профили исследований, формы отчетов, формы просмотра и т.д., поставляется программа ведения базы нормативно-справочной информации. Эта программа позволяет, при необходимости, расширять номенклатуру тестов, присутствующих в базовой поставке, определять дополнительные категории пациентов и нормы для них, сформировать бланки анализов, отчетов и т.д.

Подключение анализаторов к системе ALTEY Laboratory сводится к установке имеющихся драйверов анализаторов и созданию дополнительных драйверов. *Приборный интерфейс системы ALTEY Laboratory соответствует* стандарту ASTM E1394-91 (Standart Specification for Transferring Information Between Clinical Instruments and Computer Systems), а также ряду внутренних стандартов ведущих фирм-производителей лабораторного оборудования, что способствует подключению новых анализаторов в короткие сроки.

Система позволяет подключать к одному компьютеру до 16 анализаторов разных фирм-производителей. Результаты исследований с любого из подключаемых анализаторов доступны по компьютерной сети на рабочих местах лаборантов независимо от места подключения.

Дополнительные возможности

В системе ALTEY Laboratory предусмотрена возможность использования дополнительных технических решений, которые в отдельных случаях значительно повышают эффективность и качество работы лабораторий. Это применение штрихового кодирования биоматериалов, сканирование бланков направлений, использование электронных карт.

Архив

В состав системы помимо основной (операционной) базы данных входят несколько проблемно-ориентированных хранилищ информации, обеспечивающих поддержание статистической отчетности лабораторного подразделения, ведения раздела анализов в электронном архиве историй болезни. В системе реализованы средства подготовки стандартного набора отчетных документов для руководителя лаборатории и передачи в вышестоящие инстанции.

Программно-аппаратное окружение

Система автоматизации лабораторных исследований ALTEY Laboratory функционирует на базе Windows95, NT WorkStation (клиентские места), Windows NT(сервер), разработана по архитектуре клиент-сервер (SQL-сервер InterBase 5.1).

Имеется вариант системы на базе архитектуры файл-сервер: клиентские места - Windows95, сервер - Novell Netware 3.12, база данных Paradox 8.0.

Интегрируется с системами, использующими dBase.

Конфигурируется для работы по электронной почте и в сети Internet.

Компьютеры, минимальная конфигурация: 486DX2/66MHz, Pentium 75MHz/12Mb/340Mb.

Сеть: витая пара, Ethernet 100/10 Mbit/sec.

* * *

Внедрение Системы автоматизации лабораторных исследований ALTEY Laboratory позволяет улучшить лабораторную диагностику и медицинское обслуживание пациентов в целом за счет:

- сокращения промежутка времени от назначения исследования до получения результата;
- ориентации лаборатории на диагноз и особенности состояния каждого конкретного пациента;
- снижения вероятности потери и искажения информации;
- увеличения эффективности использования дорогостоящего лабораторного оборудования;
- освобождения лаборантов и врачей лаборатории от рутинной работы по учету исследований;
- предоставления врачам результатов лабораторных исследований за предыдущие периоды времени (на протяжении всей истории болезни и предыдущих госпитализаций);
- упрощения взаиморасчетов с заказчиками лабораторных исследований (отделения, платные больные, страховые компании, организации).

Литература

Войхонский В.Л. Алипов А.Н., Бойцов А.Б., Егорова О.В., Запольская Н.М., Литовка О.Н., Порин А.А., Муравник Л.М., Сафьянников Н.М. // Техническое оснащение лабораторных исследований. // В кн.: Медицинские лабораторные технологии. Справочник. Под ред. А.И. Карпищенко // СПБ., Интермедика. 1998. Т.1, стр. 30-125.

Кузнецов С.Л., Смирнов И.Е., Чиликин А.Н., Богатырев В.Р., Мазуров В.И., Портнов В.Н. // Телемедицинский комплекс «ДиаМорф - Cito» в консультативно-диагностической сети Федеральной программы «Дети Севера». // Клин. лабор. диагностика. // 2000, Ь 3, стр. 43 - 46.

Меньшиков В.В. // Современные возможности клинической лабораторной аналитики. // Клин. лаб. диагн. // 2000, 3, стр. 25-38.

Мунблит В.П, Тальрозе В.Л., Трофимов В.И.. // Термоинактивация микроорганизмов . // М., Наука. 1985.

Aller, R.D. and Elevitch, F.R. Symposium on computers in the clinical laboratory. Clinics in Laboratory Medicine, 3(1):1, 1983.

Antall J. // Bilder aus der Geschichte der europaischen Heilkude und Pharmazie. // Budapest, 1081.

Bissel M.G., Petersen J.R. // Automated Integration of Clinical Laboratory. // Philadelphia.// 1998.

Bosslet F., Doering D., Hilbert G., Holkott H., Lachenicht R., Schmidt G./ / Compendium Automation. Wege zur Labor-Automation.// Boehringer Mannheim. // 1977.

Bronzino, J.D. Computer Applications for Patient Care. Menlo Park, CA: Addison-Wesley, 1982.

Deindoerfer F.N., Gangwer J.R., Laird C.W., Ringold R.R. // The Yellow IRIS - Urinalysis Workstation - The first Commercial Application of « Automated Intelligent Microscopy» .//Clin. Chem. // 1985, V. 31, PP. 1491-1499.

Elevitch, F.R. and Aller, R.D. The ABC of LIS: Computerizing Your Laboratory Information System. Chicago: American Society of Clinical Pathologists Press, 1986.

Fellini D., Pirovano B. // The Automation of Sediment Urinalysis using a new Urine Flow Cytometer (UF - 100) // Clin.Chem. Lab.Med .// 1998, V. 36, PP. 909-917.

Lundberg, G.D. Using the Clinical Laboratory in Medical Decision-Making. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1983.

Maclin E., Young D.S. // Automation in the Clinical Laboratory.// In:

Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.). // W.B.Saunders Company // Philadelphia.// 1987. // pp. 160- 192.

Smith J. W., Svirbely J. R.Laboratory information systems. Medical informatics. Computer applications in health care. Eds.: E. H. Shortliffe, L. E. Perreault. Addison-Wesley Publishing Company., Ch. 9. P. 273-297

Speicher, C.D. and Smith, J.W., Jr. Choosing Effective Laboratory Tests. Philadelphia: W.B. Saunders, 1983.

Tatsumi N. // Systematisation: The Japanese Experience.// Lab. Medica Intern.// 1998. // v.15. Ь 6, p. 10.

Tighe P. // Improving the quality of urine strip testing % the Clinitek 50 urine chemistry analyser . // Europ. Clin. Labor.// 1997, June, P. 20.

Vartiainen J.// The role of positive sample identification in total logistic of sample handling and in modular laboratory automation. // Kliin/ Lab, 1998, vol.15, Ь 3, p 160-162.

УПРАВЛЕНИЕ КАЧЕСТВОМ КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ : ПЛАНИРОВАНИЕ, ОБЕСПЕЧЕНИЕ, КОНТРОЛЬ

Основные положения

Деятельность работника лаборатории, как и любая другая деятельность, подчиняется определенным объективным закономерностям, которые следует знать и стремиться им соответствовать. Формой научно-обоснованного и согласованного выражения таких закономерностей являются стандарты, т.е. документы национальных и международных организаций по стандартизации. Одним из предметов стандартизации является качество и система мер по его обеспечению.

Проблема качества лабораторных исследований была впервые поднята американскими специалистами Belk, Sunderman в 1947 г., когда при сравнении результатов исследований, проведенных в нескольких лабораториях, выяснились существенные различия между ними. С тех пор вопросы обеспечения и контроля качества не сходят с повестки дня национальных и международных организаций специалистов лабораторной медицины. В литературе имеется большое число глубоких и обстоятельных исследований, рациональных рекомендаций.

В 80-90-е годы проблема качества лабораторных исследований, выполняемых в медицинских лабораториях, вышла на государственный и международный уровень. Общепризнано необходимым декретировать требования по обеспечению качества медицинских лабораторных иссле-

дований документами государственного и межгосударственного характера. Такая форма их официального закрепления утверждает важность обязательного соблюдения необходимых условий для устойчивого получения надежной лабораторной информации, существенно важной для принятия правильных клинических решений, обеспечивающих успех диагностики болезней и лечения пациентов.

Международной организацией по стандартизации разработана серия основных документов в области обеспечения качества ISO 9000 - 9004. В последнее время они пополнились рядом документов, уточняющих международные требования по обеспечению качества применительно к работе лабораторий : ISO 9001:2000 "Системы управления качеством - требования", ISO/IEC DIS 17025 "Общие требования к компетентности тестирующих и калибрующих лабораторий "(пересмотр ISO / IEC Правило 25) и ISO / CD 15189 "Управление качеством в медицинской лаборатории". В рамках Европейского Союза те же цели преследуют документы серии EN 45000., а также Директива 98/79/ ЕС относительно требований к производству медицинских диагностических устройств для диагностики in-vitro. Конфедерацией клинической химии Европейского сообщества (ЕС4) разработаны "Существенные критерии систем качества медицинских лабораторий".

Во многих государствах были разработаны и проводятся в жизнь общенациональные требования к качеству клинических лабораторных исследований. Так, в Германии Федеральной врачебной палатой были приняты "Правила обеспечения качества в медицинских лабораториях" (1988). В США требования к качеству лабораторных исследований по многим компонентам были облечены в форму документа, принятого Конгрессом и носящего название "Clinical Laboratory Improvement Amendments" (CLIA-88). Ряд детально разработанных правил, касающихся отдельных сторон обеспечения необходимого качества лабораторных исследований, разработан Национальным комитетом клинических лабораторных стандартов США. В нашей стране к этой области имеет отношение ГОСТ 16263 - 70 "Государственная система обеспечения единства измерений. Метрология. Термины и определения", ГОСТ 15467-70 Качество продукции. Термины", ГОСТ 24525.2-80 "Управление качеством продукции" и ряд других стандартов.

Качество изделия или услуги можно рассматривать как степень соответствия требованиям потребителя или пользователя.

$$Качество = \frac{Выполнение\ реальное}{Выполнение\ ожидаемое} \to 1$$

Для достижения желательного качества изделия или услуги :

1/ Устанавливаются критерии качества, т.е. допустимые пределы вариации характерных свойств изделия, услуги, и планируются меры по обеспечению соответствия им результатов рабочего процесса (*планирование качества*) ;

2/ Проводятся запланированные меры для обеспечения желательного качества (*обеспечение качества*) ;

3/ Отслеживается соответствие результатов процесса установленным рамкам их вариации и принимаются решения о степени этого соответствия (*контроль качества*) ;

4/ При обнаружении отклонения результатов процесса за допустимые пределы вариации принимаются меры по устранению причин этих отклонений и возвращению выполнения процесса в установленные рамки.

В целом этот комплекс мер составляет *систему управления качеством*.

Проблемы количественной оценки качества рассматриваются научно-практической дисциплиной, именуемой *квалиметрия* и являющейся частью метрологии. Предметом квалиметрии является разработка научно обоснованной методологии измерения и количественной оценки качества продукции (А.Гличев, 1972). Применение принципов и методов квалиметрии и метрологии к сфере клинического лабораторного анализа должно осуществляться с учетом специфических особенностей предмета и объекта этого анализа - явлений биологического характера, происходящих в живом организме.

Влияющие факторы и виды вариации результатов клинического лабораторного анализа

Сущность аналитической деятельности клинической лаборатории - исследование биологических материалов пациентов с целью обнаружения и/или определения содержания в них клеточных или химических компонентов, отражающих протекание процессов жизнедеятельности организма и их нарушения, свойственные патологическим состояниям. Понятна необходимость соблюдения таких условий аналитических процедур в клинической лаборатории, которые обеспечивают получение наиболее достоверной информации о содержании искомых компонентов биоматериалов.

Сложность достижения такой достоверности в том, что на содержании искомых компонентов в биоматериалах пациентов одновременно сказывается влияние многих факторов, вызывающих их изменения той или иной степени и направления. Поэтому систематическое определение содержания в биоматериалах любого их компонента как у одного и того же человека на протяжении некоторого времени, так и у многих людей одновременно, дает не одно и то же значение, а некоторый их ряд - т.е. вариацию.

Наблюдаемые у здоровых людей колебания содержания в биоматериалах различных их компонентов, отражающие происходящие в организме физиологические процессы, называют ***биологической вариацией*** (Табл. 1).

Известно до 500 происходящих в организме человека колебательных процессов. В рамках биологической вариации выделяют ***межиндивидуальную или групповую вариацию***, т.е. диапазоны колебаний, свойственные группам людей, объединяемых воздействием общего долговременного фактора - пола, возраста, этноса, а также, возможно, среды устойчивого обитания, привычного характера питания (например, вегетарианства).

Наряду с групповыми особенностями каждому человеку свойственно проявлять колебания характеристик своей внутренней среды в зависимости от хронобиологических факторов (времени суток, сезона года) (см. рис. 1), от характера физической и психической активности, положения тела, состояния сна или бодрствования, причем не менее важным фактором является и генетически детерминированный характер метаболических процессов ("биохимическая индивидуальность"). Колебания этого вида называют ***внутрииндивидуальной или персональной вариацией.***

Размах этой вариации зависит от характера физиологических процессов, с которыми связан изучаемый компонент. Так, калий и натрий, концентрации которых определяют потенциал клеточных мембран, довольно жестко регулируются гомеостатическими механизмами, в частности, поддерживаются деятельностью АТФ-азного калий-натриевого насоса. Более широки колебания содержания в биоматериалах участников анаболических процессов глюкозы и холестерина. Наиболее значительны колебания концентраций продуктов катаболизма и высвобождаемых из тканей ферментов.

Общая биологическая вариация представляет собой сумму внутри- и межиндивидуальной вариаций.

Пределы колебаний содержания компонентов биоматериалов, свойственные состоянию здоровья обследуемой группы людей и обусловленные в основном межиндивидуальными биологическими факторами, на-

Таблица 1

Существенные влияния различных факторов на аналиты (по J. Marshall, 1995)

Факторы	*Аналиты*
Возраст	Щелочная фосфатаза
Пол	Половые стероиды
Беременность	Тироксин (общий)
Положение тела	Белки
Физическая активность	Креатинкиназа
Стресс	Пролактин
Потребление пищи	Глюкоза
Период суток	Кортизол

зывают ***референтными пределами*** (ранее менее точно именовались *нормой)*. Для большинства компонентов биоматериалов не существует единых референтных пределов. В различных половых, возрастных, этнических популяциях референтные пределы могут существенно различаться. Кроме того, референтные пределы в значительной степени зависят от применяемых методов исследования.

Выходящие за референтные пределы значения компонентов биоматериалов, обусловленные патогенными факторами или компенсаторными реакциями организма, рассматриваются как ***патологическая вариация.*** Основой для диагноза патологического состояния может служить достоверное отличие результата исследования соответствующего компонента от значений референтного интервала.

Рис.1. Хронобиологические факторы, влияющие на содержание компонентов биологических материалов.

Однако, при исследовании биоматериалов пациентов, находящихся в лечебном учреждении, нужно принимать во внимание также разнообразные воздействия на организм обследуемого диагностических и лечебных мер. В их основе лежит взаимодействие соответствующих характеру диагностического или лечебного пособия физических или химических факторов с некоторыми системами организма, проявляющееся в изменениях состава биоматериалов. В части случаев это может приводить к выходу значений ряда компонентов за референтные пределы, что, при недостаточном понимании такого поведения аналитов, способно стать причиной неправильной интерпретации результатов исследований как патологических. Такую вариацию можно назвать ***ятрогенной***, т.е. вызванной действиями врача. (Табл.2)

Таблица 2

Ятрогенные влияния

Диагностические процедуры
- Пункции, биопсии, пальпация
- Эндоскопия
- Функциональные тесты (ГТТ и др.)
- Физический стресс (нагрузки, эргометрия)
- Иммуносцинтиграфия
- Контрастные среды

Оперативные вмешательства

Другие лечебные процедуры
- Вливания и переливания
- Диализ
- Ионизирующее облучение

Лекарства

Знание причин и механизмов ятрогенной вариации позволяет исключить на преаналитическом этапе те диагностические или лечебные факторы, которые мешают выявлению истинного состояния биосред организма.

Лекарственные средства, принимаемые пациентом, влияют на результат анализа двояким образом: а) изменяя концентрацию исследуемого аналита за счет своего фармакологического влияния на организм пациента (клиническая интерференция) ; б) взаимодействуя с реагентами в процессе самой аналитической процедуры (технологическая или хими-

ческая интерференция) (табл.3, 4) (рис. 2). Степень этих влияний очень вариабельна и зависит от дозы лекарства, особенностей организма пациента, метода исследования. Поэтому детальная информация приводится при описании отдельных методик (Young; Tietz).

Влияние диагностических процедур связано: а) с их возможным воздействием на отдельные органы, состояние которых отражается в изменениях содержания компонентов в биожидкостях; б) с химической интерференцией диагностического средства, введенного в организм пациента и содержащегося в его биожидкостях, с реагентами в процессе лабораторного анализа.Клиницисты должны знать о возможных влияниях проводимых пациенту диагностических процедур и принимаемых им лекарств на результаты назначаемых лабораторных тестов. Если это не наносит вреда пациенту, такие лекарства должны быть временно отменены, а небезразличные для исследования диагностические процедуры отложены.

Наряду с этим, направленное воздействие определенных факторов, вызывающее некоторую степень отклонения лабораторных результатов, *используется в целях изучения резервов физиологических систем* организма (т. наз. функциональные или нагрузочные тесты).

Ятрогенная вариация, в свою очередь, является одним из составных элементов т.наз. ***преаналитической вариации,*** вызываемой, кроме того, также отклонением от правил сбора, первичной обработки, хранения и транспортировки в лабораторию взятых у обследуемого образцов биоматериалов. Количественная оценка преаналитической вариации (Fuentes-Ardieriu et al., 1999), вычисленной как разность общей и внутрисерийной аналитической варианс (общая варианса вычислялась из различий между результатами определения двух проб у одного и того же пациента, взятых разными флеботомистами и направленными в лабораторию с про-

$$S_g^2 = \frac{\sum (x-y)^2}{2 \times n}$$

межутком в 30 мин согласно уравнению:

Все измерения производились повторно из одной пробы, взятой случайным образом из каждой пары. На основе этих данных рассчитывались

$$S_{MV}^2 = \frac{\sum (Z - Z^1)^2}{2n}$$

величины внутрисерийной аналитической варианс по уравнению:

Сравнение двух видов вариации приведено в таблице 5.

Таблица 3

Механизмы интерференции лекарств (по Guder et al., 1995)

Вид интерференции	Механизм	Лекарство	Аналит	Измен.
Биологич. влияние in vivo	Индукция ферментов	Фенитоин	гамма-ГТФ	Повыш.
	Торможение ферментов в печени	Аллопуринол	Мочевая кислота	Сниж.
	Торможение ферментов в плазме	Циклофосфамид	Холинэстераза	Сниж.
	Повыш. связывания с белком	Пероральные контрацептивы	Медь (церулоплазмин)	Повыш.
	Конкуренция с эндогенными компонентами за глюкуронизацию	Новобиоцин	Билирубин неконъюгир.	Повыш.
	Антивитаминный эффект	Варфарин, фенкупромон	Белок С протромбин	Сниж. Сниж.
	Цитотоксичность			
	- печени	Бигуаниды	Лактат	Повыш.
	- почки	Гентамицин	АлАТ	Повыш.
		Цисплатин	Креатинин	Повыш.
Химич. и физич. интерференция in vitro	Перекрестная реактивность в иммуноисслед.	Спиронолактон	Дигоксин	Повыш.
	Химическая реакция с реактивом Яффе	Цефалатин	Креатинин	Повыш.
	Образование атипичных гемоглобинов	Салицилаты	Гемоглобин А1	Повыш.

Как видно из приведенных данных, из 20 аналитов у 10 аналитов преаналитическая вариация равна или больше 2%., причем для 8 аналитов преаналитическая вариация оказалась больше аналитической.

Должны обязательно учитываться влияния условий, в которых находится пациент перед взятием у него образца биоматериала для исследования. В положении стоя объем крови на 600-700 мл меньше, чем в положении пациента лежа, поэтому из-за снижения объема плазмы концентрации

Таблица 4

Примеры влияния вливаний (по Guder et al., 1995)

Вещество	Аналит	Измен.	Примечания
Декстран	Тромбиновое время, рептилазное время	Сниж.	на 5-10 с медленнее
	Фактор фон Виллебранда	Сниж.	
	Общий белок в сыворотке, плазме	Повыш.	Биурет, метод-зависим. (мутность, образов хлопьев, зеленое окрашивание)
гамма-Глобулин	Серологич. исследования при вирусных, бактериальных инфекциях		Ложноположительные результаты
Электролит	K, Na, Mg	Повыш	Загрязнение
Глюкоза	Глюкоза	Повыш	Загрязнение
	Неорг. фосфаты, K Амилаза, билирубин	Сниж. Сниж.	Инсулин До 15%, особенно у новорожденных
Фруктоза	Мочевая кислота	Повыш	Метаболич. эффект
Цитрат (переливание крови)	Величина pH в крови	Сниж.	
	Коагуляционные пробы	Повыш Сниж.	Торможение

в ней белков и связанных с белком компонентов (лекарства, кальций, билирубин, железо, а также число лейкоцитов, эритроцитов, гематокрит) в ряде случаев повышены до 10%. Снижение капиллярного давления при положении пациента лежа приводит к выходу в кровь тканевой жидкости и повышению в крови концентраций ряда ферментов, иммуноглобулинов, холестерина, триглицеридов, альбумина, тироксина от 5 до 11%.

Продолжительное пребывание на постельном режиме может привести к задержке жидкости и снижению концентрации белков и связанных с белком компонентов крови. Иммобилизация сопровождается потерей кальция из костной ткани и повышением ионизированного кальция в крови, однако, из-за понижения связанного с белком кальция значение общего кальция мало меняется. Уровень ферментов, связанных с дея-

тельностью мышц несколько снижен, с мочой экскретируется больше азота и кальция. Наоборот, даже умеренная физическая нагрузка повышает содержание глюкозы, инсулина, лактата, мочевой кислоты, активность аспартатаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы, альдолазы, креатинкиназы. Физически тренированные люди обычно имеют более высокие уровни ферментов, мочевины, мочевой кислоты, креатинина, тироксина, чем нетренированные люди. Общее содержание липидов, общего холестерина, холестерина липопротеидов низкой плотности, триглицеридов у тренирующихся людей снижено, тогда как содержание холестерина липопротеидов высокой плотности и свободных жирных кислот повышено.

Таблица 5

Сравнение преаналитической и аналитической вариации

Аналит	CV% преаналит.	CV% аналитич.
Раковоэмбр. антиген	0, 0	14, 0
Ферритин	0, 0	8, 1
Железо	0, 0	2, 1
Мочевина	0, 0	2, 3
Натрий ион	0, 4	0, 9
Кальций	0, 7	1, 2
Мочевая кислота	0, 8	1, 5
Триглицериды	1, 2	4, 1
Альбумин	1, 3	1, 6
АлАт	1, 4	3, 2
Неорганич. фосфаты	2, 0	1, 7
Общий белок	2, 0	1, 0
Креатинин	2, 3	1, 7
ГГТ	2, 3	3, 5
Калий ион	3, 1	0, 9
Глюкоза	3, 2	2, 1
ЩФ	3, 4	3, 2
АсАТ	3, 4	2, 3
КК	3, 4	1, 5
Билирубин	4, 2	3, 2

Рис.2. Схема механизмов лекарственной интерференции.

Прием пищи повышает содержание в крови глюкозы, холестерина, триглицеридов, свободных жирных кислот, аминокислот, неорганических фосфатов, калия, железа, т.е. веществ, содержащихся в пищевых продуктах, а также тех регуляторных соединений, которые вырабатываются в организме в ответ на включение пищевых компонентов в метаболизм (инсулин) и метаболитов (мочевая кислота). Характер изменений зависит от диеты (углеводная, жирная, белковая, бессолевая и т. д.). Так, богатая белком пища повышает содержание азота мочевины, фосфора, уратов примерно на 12 ч, а холестерина, гормона роста, инсулина, глюкагона — на 1—2 ч. Углеводная диета обладает менее выраженным влиянием на эти компоненты, за исключением инсулина.

Сильное воздействие оказывает прием алкоголя, особенно в зависимости от дозы и продолжительности его потребления, на содержание гамма-глютамилтрансферазы и среднего объема эритроцита. Употребление кофе, крепкого чая, колы за счет содержащегося в них кофеина вызывает зависящие от дозы характерные изменения: повышение содержания в крови и моче катехоламинов, метанефрина в моче, неэстерифицированных жирных кислот, глицерина, глюкозы, кортизола, кадмия, карбоксигемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов в крови, среднего объема эритроцита. Снижается толерантность к глюкозе. Под влиянием кофеина желудком секретируется большее количество желудочного сока, соляной кислоты, пепсина. Увеличивается выведение мочи, экскреция эритроцитов и эпителиальных клеток канальцев почек.

Эти закономерные влияния являются основой требования брать кровь для анализов, как правило, натощак.

Суточные колебания содержания гормонов носят довольно регулярный характер (табл. 6), отражая их участие в управлении процессами жизнедеятельности. Они находятся под контролем высших отделов головного мозга. Ритмы некоторых гормонов могут существенно меняться под влиянием воздействий внешней среды на организм: стресс вызывает реакцию со стороны гипофизарно-надпочечниковой системы; прием пищи вызывает закономерный ответ со стороны гормонов поджелудочной железы и т.п.

Обобщая изложенное выше, можно суммировать совокупность различных внелабораторных факторов, способных повлиять на результаты лабораторного анализа, в следующей таблице 7.

Суммарные влияния смены положения тела, уровня физической активности, дневного света и темноты, сна и бодрствования, приема пищи вызывают циклические колебания содержания многих аналитов в тече-

Таблица 6

Колебания содержания гормонов в течение суток

Аналит	*Максимум*	*Минимум*
Кровь		
Кортизол	6—8 ч утра	16 ч
Тестостерон	Ночь	
Пролактин	Ночь	
Тиреотропин	2—4 ч ночи	18—22 ч
Ренин	Раннее утро, сон	После полудня
Соматотропин	Ночь	
Инсулин	Утро	
Моча		
17-кетостероиды	Ночь	После полудня
17-оксикортикостероиды	Ночь	После полудня

ние суток. Размах этих колебаний превышает величину аналитической вариации (табл. 8).

Хотя степень влияния перечисленных факторов далеко не одинакова в отношении различных аналитов, тем не менее они не могут игнорироваться и их следует принимать во внимание как основу для определения правил сбора биоматериала, а также при трактовке результатов анализа

Принципы управления качеством клинических лабораторных исследований

Клиническое лабораторное исследование образца биоматериала, взятого у пациента, имеет целью установить, отвечает ли состав этого образца тому, который обычно наблюдается у здоровых людей, или в нем имеются отклонения, которые могут достоверно указывать на наличие патологического процесса.

Для того, чтобы успешно решать эту задачу, персонал лаборатории должен обладать :

1. Достаточно специфичным по отношению к искомому аналиту и достаточно чувствительным применительно к его реальному содержанию в биоматериале методом анализа.

2. Материальными средствами исследования биоматериала, позволяющими реализовать соответствующую методу аналитическую процедуру: химическими или биологическими реагентами необходимой чисто-

Таблица 7

Внелабораторные факторы, влияющие на результаты лабораторных исследований

1. *Ошибки идентификации пациента и образца биоматериала*

2. *Биологические факторы*

а/ учитываемые :

пол, возраст, этнос, физиологическое состояние (физическая тренированность, беременность), биологические ритмы,

влияния среды обитания

б/ устранимые :

прием пищи, голодание, положение тела, физическая активность, курение, употребление алкоголя

3.*Ятрогенные факторы*

а/ диагностические процедуры

б/ оперативные вмешательства

в/ различные лечебные процедуры

г/ лекарства (в т.ч. принимаемые без назначения врача)

4. *Условия взятия, временного хранения и транспортировки биоматериала*

а/ время взятия, срок сбора

б/ подготовка участка тела для взятия материала

в/ процедуры взятия крови, мочи, других биоматериалов

г/ посуда (чистота, материал)

д/ воздействие факторов среды (температура, газы воздуха)

е/ консерванты, антикоагулянты

ж/ процедуры первичной обработки (смешивание, центрифуги- рование, охлаждение, замораживание)

5. *Свойства аналита*

а/ биологический полупериод жизни аналита

б/ стабильность в крови при различных температурах

в/ метаболизм in vitro, включая чувствительность к свету, температуре и т.д.

ты и специфичности; пробоподготовительной и измерительной аппаратурой достаточной точности; калибровочным материалом, в наибольшей мере соответствующим составу искомого аналита в организме пациента.

Таблица 8

Общая и аналитическая вариация в образцах сыворотки (8—14 ч) (по P. Winkel и соавт., 1975)

Аналит	*Средняя*	*Общая вариация, %*	*Аналитическая вариация, %*
Азот мочевины, мг/100 мл	14	22,5	2, 5
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	6	56	17
Альбумин, г/100 мл	4, 5	5, 5	3, 9
Аспартатаминотрансфераза, Ед/л	9	25	3, 6
Железо, мкг/100 мл	116	36, 6	3, 4
Калий, ммоль/л	4, 4	7, 1	2, 8
Кальций, мг/100 мл	10, 8	3, 2	2, 7
Кислая фосфатаза, Ед/л	3	15	8
Креатинин, мг/100 мл	1, 0	14, 5	6, 3
Лактатдегидрогеназа, Ед/л195	16	12	
Мочевая кислота, мг/100 мл	5, 6	11, 5	2, 6
Натрий, ммоль/л	141	1, 9	1, 8
Общий белок, г/100 мл	7, 3	4, 8	1, 7
Общие липиды, г/л	5, 3	25, 0	3, 6
Фосфаты, мг/100 мл	3, 8	10, 7	2, 4
Хлориды, ммоль/л	102	3, 8	3, 4
Щелочная фосфатаза, Ед/л	63	20	3
Холестерин, мг/100 мл	193	14, 8	5, 7

3. Контрольными процедурами и материалами, позволяющими оценить аналитическую точность выполненного исследования и предотвратить выдачу лабораторией ошибочной информации.

4. Сведениями о содержании искомого аналита в организме человека в условиях здоровья (референтные пределы) и при подозреваемой патологии.

Некоторые из факторов, влияющих на результат лабораторного анализа, носят объективный характер, их нельзя устранить, однако их возможное влияние должно учитываться при оценке результата. Другие факторы могут быть устранены полностью или их влияние поддается ограничению. Понимание сущности и роли многообразных факторов, способных повлиять на результат исследования, является основой для принятия мер, необходимых для полного устранения или сведения их влияния до того минимума, который реально достижим и приемлем. Комп-

лекс таких мер называется ***управлением качеством исследований***. Он состоит из трех разделов (по ГОСТ 24525.2-80 специальных функций) : *планирование, обеспечение, контроль качества*. (Рис.3)

СИСТЕМА МЕР ПО УПРАВЛЕНИЮ КАЧЕСТВОМ КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Планирование качества

Цель ***планирования качества*** - определить степень воздействия неустранимых влияний на ожидаемый результат исследования и установить меру предельно допустимого отклонения реального результата от теоретически ожидаемого, т. е. уровень точности исследований, достижимый с применением имеющихся в распоряжении лабораторий технических средств, химических и биологических реагентов и расходных материалов и достаточный для получения надежной лабораторной информации о состоянии внутренней среды пациента. Норма точности должна быть определена применительно к каждому аналиту. Исходные положения для установления норм точности заслуживают подробного обсуждения. (см. раздел "Выбор и установление критериев аналитического качества")

Конкретные меры по планированию качеств лабораторных исследований применительно ко всей системе здравоохранения могут быть формализованы следующим образом:

Установление норм точности клинических лабораторных исследований

Основания : - биологическая вариация

- достигнутый уровень точности при существующем методическом и материально- техническом оснащении лабораторий (по данным внешней оценки качества)

- медицинские требования

- экспертная оценка

Форма: - нормативный документ Минздрава РФ (в последующем - "Стандарт аналитической точности клинических лабораторных исследований")

По мере совершенствования работы лабораторий и овладения лабораторным персоналом способами планирования качества исследований, наряду с общероссийскими критериями точности и в соответствии с ними, могут в отдельных лабораториях и применительно к отдельным аналитам устанавливаться дифференцированные нормативы точности с уче-

ПЛАНИРОВАНИЕ КАЧЕСТВА

Установление норм точности КЛИ

Основы: - биологическая вариация
- медицинские требования
- оснащение КДЛ
- экспертная оценка

Форма: - нормативный документ МЗ

ОБЕСПЕЧЕНИЕ		КОНТРОЛЬ	
Приборы Реагенты	Допуск в КДЛ Комитет по новой медицинской технике при МЗ РФ	Внутрилабораторный контроль	Повседневно, во всех сериях, контрольные карты, сверка норм точности, контрольные правила Заведующий КДЛ
Методы КЛИ	Апробация, рекомендация Экспертные лаборатории Комиссия по КДЛ МЗ РФ	ВОК	Участие лаборатории в ФСВОК, негосударственных и региональных системах ВОК. Руководитель учреждения, заведующий КДЛ
Мат. тех. оснащение КДЛ	Руководитель учреждения, заведующий КДЛ при МЗ РФ	"Клинич. аудит"	Руководитель учреждения
Предотвращение преаналитических помех	Руководитель учреждения		
"Руководство по качеству" (составление, выполнение)	Заведующий КДЛ		

Рис.3. Система мер по управлению качеством клинических лабораторных исследований

том требований "Стандарта аналитической точности клинических лабораторных исследований" и его гибкого применения в допускаемых этим стандартом вариантах (см. раздел "Основы планирования качества исследований в лабораториях").

Обеспечение качества

Процесс ***обеспечения качества*** охватывает преаналитический, аналитический и постаналитический этапы. На каждом из этапов должны быть выделены объекты наибольшего внимания, т.е. возможные факторы и источники ошибок, установлены предупредительные меры, осуществление которых должно быть вменено в обязанность соответствующим исполнителям и постоянно реализовываться ими.

Результат лабораторного исследования, выполненного в клинико-диагностической лаборатории (КДЛ), зависит не только от самой КДЛ. Лаборатория пользуется оборудованием и реагентами, произведенными промышленностью и допущенными к применению в учреждениях здравоохранения страны Минздравом; методы исследования заимствованы ею из литературы или из инструкций по применению наборов реагентов. Оснащение лаборатории прямо зависит от средств, выделенных руководством учреждения, в составе которого действует лаборатория. Персонал лаборатории обладает знаниями и умениями, предусмотренными программами подготовки и квалификационными характеристиками, устанавливаемыми на федеральном уровне. Поэтому в системе мер, предусмотренной впервые вводимым в действие *"Положением об организации управления качеством клинических лабораторных исследований в клинико-диагностических лабораториях учреждений здравоохранения Российской Федерации"* (см.в данном томе), определены роль и ответственность органов и организаций различного уровня, деятельность которых влияет на лабораторные результаты.

КДЛ учреждений здравоохранения в нашей стране довольно разнообразны по арсеналу выполняемых исследований, по своему материально-техническому оснащению, поэтому, исходя из общих рекомендаций, каждая лаборатория должна иметь свою индивидуализированную программу мер по управлению качеством иследований. Весь свод условий, порядка, процедур, критериев, которые приняты в данной лаборатории при планировании, обеспечении и контроле качества исследований, должен быть систематично описан и обоснован соответствующими документами в *"Руководстве по качеству клинических лабораторных иссле-*

дований в клинико- диагностической лаборатории" данной больницы, поликлиники, диспансера, санатория, военного госпиталя, коммерческого медицинского предприятия, и т.п.

Меры по обеспечению качества на различных уровнях системы здравоохранения

1.Допуск для использования в клинико-диагностических лабораториях страны приборов и реагентов

Основания: - положительные результаты технических и клинических испытаний, соответствие установленным требованиям

Форма: - решения Комитета по новой медицинской технике Минздрава РФ

2. Рекомендация для использования в клинико-диагностических лабораториях страны методов клинических лабораторных исследований

Основания: - положительные результаты апробации в экспертных лабораториях, соответствие установленным требованиям

Форма: - решения Комиссии по клинической лабораторной диагностике Минздрава РФ

3. Материально-техническое оснащение клинико-диагностических лабораторий

Основания: - примерный перечень приборов и оборудования для клинико-диагностических лабораторий (приказ Минздрава РФ), табель оснащения

Форма: - решение руководителя учреждения (при рекомендации заведующего лабораторией)

4. Предотвращение преаналитических помех

Основание: - правила подготовки пациентов к выполнению лабораторных тестов;

- правила сбора образцов биоматериалов, их хранения и транспортировки в лабораторию

Форма: - документы, утверждаемые руководителем учреждения (при рекомендации заведующего лабораторией), в перспективе - соответствующие стандартизационные документы

5. Систематизация мер по обеспечению качества в лаборатории на основе совокупности нормативных и распорядительных документов

Основание: - приказ Минздрава РФ (типовая модель "Руководства по качеству")

Форма: - "Руководство по качеству" каждой данной клинико-диагностической лаборатории

6. Подготовка кадров специалистов клинической лабораторной диагностики

Основание: - квалификационные характеристики; типовые программы подготовки (приказ Минздрава РФ)

Форма: - прохождение циклов подготовки в образовательных учреждениях; овладение аналитическими методами и навыками работы на приборах на рабочем месте; самообразование; сдача квалификационного экзамена для получения сертификата специалиста.

Контроль качества

Контроль качества представляет собой систему постоянно и повсеместно проводимых контрольных процедур, позволяющих оценить степень соответствия точности исследований, реально достигнутой в каждой аналитической серии, с уровнем требований к точности исследований, заданных при планировании качества. В случае, если обнаруженная при контроле качества реальная точность исследований не соответствует запланированному уровню требований, результаты данной аналитической серии должны быть отброшены, а причины погрешности должны быть установлены и устранены, т.е. должно быть обеспечено необходимое качество повторно производимых исследований того же биоматериала.

Виды контроля качества:

1. Внутрилабораторный контроль качества

Основание: - правила проведения контроля (приказ Минздрава РФ)

Форма: - сверка собственных результатов исследований контрольных проб (смещение и общая аналитическая вариация) с нормами точности перед построением контрольных карт; ежесерийное выполнение контрольных проб; проверка точности текущих результатов по контрольным правилам (для всех исследуемых аналитов)

2. Внешняя оценка качества

Основание: - приказ Минздрава РФ об обязательности участия всех лабораторий; решение руководителя учреждения (финансирование) ; рекомендация заведующего лабораторией (перечень контролируемых исследований) ; в перспективе - отраслевой стандарт "Внешняя оценка качества клинических лабораторных исследований"

Форма: - обязательное участие лаборатории в Федеральной системе внешней оценки качества; дополнительное участие в региональных или негосударственных системах внешней оценки качества

3. "Клинический аудит"

Основание: - решение руководителя учреждения

Форма: - клинико-лабораторная конференция; оценка клиницистами эффективности работы лаборатории

Понятно, что ***оптимальная надежная и экономичная система контроля качества должна обеспечивать наибольшую вероятность обнаружения недопустимой погрешности при минимальной вероятности ложного отбрасывания аналитических серий.***

Меры обеспечения качества на преаналитическом этапе

При взятии определенных видов биоматериалов следует иметь в виду изложенные ниже требования, чтобы избежать извращения результатов лабораторных исследований.

Взятие крови

Венозная кровь – пациент в положении сидя или лежа не менее 20 мин до венепункции (см. раздел "Влияющие факторы и виды вариации результатов клинического лабораторного анализа") ;

– брать кровь из средней локтевой вены в передней локтевой ямке;

– кожу на месте пункции дезинфицировать спиртом;

– наложить резиновый жгут на 10—15 см выше места пункции;

– использовать острую стерильную полую иглу с внешним диаметром 1,06—0,71 мм;

– жгут удерживать только тот период времени, который требуется для сбора необходимого для анализа объема крови; чрезмерно длительный стаз (> 1 мин) способен вызвать изменение концентрации белков от 5 до 15%, калия, железа, билирубина, холестерина и т. д.

– жгут снимать перед извлечением иглы из вены;

– применение закрытых резиновыми мембранами вакуумных пробирок со специальными обоюдоострыми иглами убыстряет процесс сбора крови;

– слишком быстрое всасывание крови с помощью шприца может вызвать гемолиз, как и использование игл со слишком большим просветом (завихрение в токе крови способствует разрушению эритроцитов) ;

– кровь из венозного катетера, используемого для инфузии растворов, можно брать не ранее, чем через 3 мин после прекращения вливания; не следует брать кровь для анализа тех компонентов, которые содержатся во вводимом растворе (электролиты, глюкоза).

Капиллярная кровь (пункция кожи) – при необходимости использовать небольшой объем крови;

– для увеличения кровотока согреть место пункции; нельзя массировать для избежания притока в кровь тканевой жидкости;

– тщательно дезинфицировать кожу в месте пункции;

– для взятия капиллярной крови пунктировать подушечки кончиков пальцев, у детей до 1 года — латеральную или медиальную часть подошвы у пятки;

– для пункции использовать острый стилет с жалом менее 2,5 мм;

– первая капля крови отбрасывается, последующие собирают в капиллярные сосуды малого объема (260–350 мкл, 1,5–2,7 мм внутренний диаметр) ; мазки крови следует готовить в первые 2–3 часа после взятия материала;

– при взятии крови на скрининг у новорожденных следует к большой капле крови прикоснуться фильтровальной бумажкой, чтобы последняя пропиталась кровью.

Кровь, взятая с помощью пункции кожи, по составу ближе к артериальной, чем к венозной, кроме того в ней имеется примесь интерстициальной и внутриклеточной жидкости. Разная степень этих примесей может влиять на результаты определения калия, общего белка, белково-связанных компонентов, в том числе, кальция и билирубина.

Артериальная кровь – образец забирается путем пункции лучевой, брахиальной артерий, производимой врачом или специально обученным работником со средним образованием:

– у новорожденных возможно взятие крови через катетер, введенный в пупочную артерию;

– при невозможности пунктировать артерию используют кожную пункцию согретого горячей мягкой салфеткой участка тела; эта артериализованная капиллярная кровь может быть использована для анализа pH и pCO_2 (не для pO_2!) ;

– желательно кровь собирать путем свободного истекания в гепаринизированную капиллярную пробирку, содержащую тонкие металлические полоски для последующего тщательного перемешивания с помощью магнитной мешалки. Газы крови исследовать немедленно.

Цельная кровь – используется преимущественно для анализа газов крови и лактата.

Сыворотка крови – наиболее часто используется в клинической лаборатории, получается при свертывании крови и отделении сгустка (центрифугирование через 15–30 мин после завершения свертывания крови). Отделение от клеток в пределах 2 ч после сбора крови. Если сыворотка

не исследуется тотчас же, хранить обычно в закрытых пробирках при 4°С, для нестабильных аналитов – хранить в морозильнике при -20 °С. Некоторые аналиты (например, изоферменты лактатдегидрогеназы) более стабильны при комнатной температуре.

Хранение и центрифугирование в закрытых пробирках предотвращает испарение жидкой части образцов и контакт с воздухом (мешает стабильности двуокиси углерода, кислой фосфатазы, ионизированного кальция).

Плазма крови – применяется несколько реже, чем сыворотка: является материалом выбора для экстренных исследований, так как может быть получена быстрее, чем сыворотка, и в большем объеме. Отделение клеток в пределах не более 2 ч. после взятия образца. Существенных отличий значений большинства аналитов между сывороткой и плазмой нет. Исключения составляют калий, лактатдегидрогеназа, электрофорез фибриногена. Использование цельной крови и плазмы в анализах требует применения антикоагулянтов и консервантов.

Гепарин – применяется наиболее часто, проявляет меньшую интерференцию, тормозит превращение протромбина в тромбин и образование фибрина из фибриногена; за исключением аммониевой соли не влияет на объем эритроцита; соли аммония и лития используются при получении плазмы для исследования натрия и калия.

Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТУК) – является хелатным агентом, связывая кальций, предупреждает свертывание крови; в концентрации 1–2 мг/мл крови сохраняет клеточные компоненты крови.

Фторид натрия – лучший консервант для глюкозы в крови – тормозит ферменты гликолиза; слабый антикоагулянт; мощный ингибитор уреазы и ряда других ферментов в сыворотке.

Цитрат натрия – в клинической химии применяется редко; широко используется в исследованиях свертывания, поскольку его эффект быстро обращается при добавлении Са.

Натриевая, калиевая, аммонийная и литиевая соли щавелевой кислоты – образуют нерастворимые комплексы с ионами Са и тормозят свертывание. Калиевая соль оксалата способна занижать показатели гематокрита из-за потери жидкости и обмена электролитов через мембрану эритроцитов. Оксалаты тормозят многие ферменты: фосфатазы, амилазу, лактатдегидрогеназу.

Гемолиз – видимые признаки при концентрации гемоглобина в сыворотке более 20 мг/100 мл. Приводит к росту содержания в сыворотке компонентов, имеющих более высокую концентрацию в эритроците по

сравнению с плазмой — альдолазы, общей кислой фосфатазы, лактатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы, калия, магния. Могут повыситься показатели неорганического фосфата, аспартатаминотрансферазы, холестерина (колориметрия).

Сбор мочи

Случайная порция – обычно собирается утром, натощак для микроскопии мочевого осадка и для обнаружения необычных компонентов или непормальных количеств компонентов (белки). Осадок мочи следует исследовать не позднее, чем через 2—3 ч после сбора, т. е. образец необходимо быстро доставлять в лабораторию.

Повременный сбор мочи – обычно производится за точно определенный период времени (1, 4, 24 ч).Из этого объема нельзя брать отдельные случайные пробы. После предварительного опорожнения мочевого пузыря мочу собирают для оценки выведения глюкозы при глюкозотолерантном тесте.

Сбор мочи через катетер у тяжело больных производится для микробиологических исследований.

Длительный сбор мочи – предназначен для предупреждения эффектов краткосрочных биологических вариаций, должен сопровождаться четкими инструкциями относительно ограничений в диете.

Способы консервации при сборе мочи

Для предупреждения роста микроорганизмов или для предотвращения химических изменений компонентов в мочу при ее сборе добавляют консерванты: смесь сульфата натрия (10 г), бихромата калия (25 г) на 100 мл воды, 5 мл смеси на 100 мл мочи; 5–7, 5 мл хлороформа на 1 л воды, 20–30 мл на 1 л мочи; тимол (несколько кристаллов).

Окисление до pH 3 используют при сборе мочи за сутки для предупреждения изменений содержания кальция, стероидов, катехоламинов, ванилилминдальной кислоты. (При этом осаждаются ураты!).

Сульфамидная и борная кислоты также преципитируют ураты.

Толуол создает на поверхности мочи пленку, предотвращая контакт с воздухом (не мешает росту анаэробов; *способен гореть!*).

Бикарбонат натрия предохраняет от разрушения порфирин и уробилиноген (табл. 9).

Повременные порции мочи после завершения сбора должны безотлагательно исследоваться в лаборатории.

Перед отбором образцов для отдельных тестов весь объем собранной мочи следует тщательно перемешать для достижения его гомогенности. Посуда для отдельных тестов не должна быть пластмассовой, если консервантом был толуол или другое органическое соединение; для исследования экскреции следовых металлов посуда должна быть неметаллической.

Хранение мочи в холодильнике в период ее длительного сбора — наиболее приемлемый способ консервации.

Сбор кала

– производится для выявления нарушений пищеварения, наличия паразитов кишечника, а также для обнаружения скрытой крови (кровоточащая язва, злокачественное поражение кишечника). В последнем случае пациенту предлагают в течение трех предшествующих дней не употреблять в пищу мясные продукты.

Взятие спинномозговой жидкости (врач)

Производится путем пункции люмбарной области, иногда СЖ получают при оперативном вмешательстве на мозге. При необходимости подсчета клеток добавляется ЭДТУК для предотвращения образования сгустка фибрина. Клетки в СЖ следует подсчитывать не позже, чем через 1 ч после взятия материала, т. е. он безотлагательно должен доставляться в лабораторию.

Взятие синовальной жидкости, артроцентез (производится врачом)

- возможно при накоплении жидкости в полости сустава в процессе воспаления. В стерильную пробирку берут образец для микробиологического исследования, для исследования глюкозы и белка, в пробирку с ЭДТУК

- для подсчета числа эритроцитов, лейкоцитов и их субгрупп.

Взятие амниотической жидкости, амниоцентез (производится врачом)

Пробирку с материалом для измерения отношения лецитин / сфингомиелин немедленно помещают на лед, образец для исследования билирубина собирают в посуду из темного стекла для предотвращения распада аналита под действием света.

Таблица 9

Обычно используемые консерванты для мочи (по Young, Bermes, 1987)

Аналиты	Способы консервации						
	Замо—раживание	Ледяная уксусная кисл. 33% 20 мл/24	Борная кислота	Толуол (на поверхн. образца)	Конц. солян. кисл. 6 моль/л 10 мл/24 ч	Сода 5г/24 ч	Петрол. эфир 100 мл/24 ч
Азот	+				+		
Альдостерон	+	+	+				
Аминокислоты				+	+		
б-Аминолевулиновая кислота		+			+		
Ванилилминдальная кислота			+		+		
5-Гидроксииндолуксусная кислота			+		+		
Гидроксипролин				+	+		
Гомогентизиновая кислота	+						
Кальций					+		
Катехоламины		+			+		
17-Кетостероиды		+	+				
Кортизол (свободный)		+	+				
Магний					+		
Медь					+		
Метанефрины		+			+		
Мочевая кислота				+			
Оксалат					+		
Осмоляльность	+						
Порфирины						+	
Прегнантриол		+	+				
Ртуть					+		
Уробилиноген	+						+
β-единица хорионич. гонадотропина			+				
Цинк					+		
Цистин	+			+	+		
Цитрат			+	+			
Эстрогены		+	+				

Требования к условиям транспортировки образцов крови, взятых для исследования определенных компонентов

Охлаждение (t < 15°С), замораживание образца –сыворотка для исследования: альдолазы, аскорбиновой кислоты, желчных кислот, кальцитонина, С-пептида, лимонной кислоты, комплемента, креатина, креатинина, изоферментов креатинкиназы, гастрина, гистидина, инсулина, изоцитратдегидрогеназы, фенотипирования липопротеинов, лизоцима, паратгормона, пепсиногена, плацентарного лактогена, пролактина, простагландина F2α;

- сыворотка, ацетоацетат, для исследования: ацетона

- сыворотка, цитрат, для исследования кислой фосфатазы;

- плазма (гепарин, 0,2 мг/мл) для исследования : АКТГ, аминокислот, эстрадиола, жирных кислот (свободных и эстерифицированных),

- плазма (ЭДТУК, 2 мг/мл) для исследования : холестерина липопротеидов высокой плотности,

- сыворотка, плазма (вместо замораживания - добавление борной кислоты, 25 мг/мл) : для исследования альдостерона,

- цельная кровь (ЭДТУК, 2 мг/мл) для исследования глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы,

Защита от света - плазма (ЭДТУК, 2 мг/мл), для исследования пиридоксаль фосфата (витамина B_6) ;

- плазма, для исследования витамина А.

Температура выше 20°С - сыворотка, для исследования криоглобулинов.

Другие особенности обработки - сыворотка, добавить 10 мг/мл фторида натрия : для исследования алкоголя;

- сыворотка, не использовать гепарин, для исследования барбитуратов;

- плазма, ЭДТУК, 2 мг/мл, для исследования карцино-эмбрионического антигена;

- цельная кровь, гепарин, 0,2 мг/мл, для исследования холинэстеразы;

- плазма, цитрат, примерно 4 мг/мл, не использовать гепарин, для исследования фибриногена;

- сыворотка, цельная кровь, не собирать в стеклянную посуду, для исследования фторида;

- цельная кровь, гепарин, 0,2 мг/мл, добавить 10 мг/мл фтористого натрия, для исследования галактозы;

- цельная кровь, немедленно развести с равным объемом 5% (50 г/л) перхлорной кислоты, встряхнуть и смешать, для исследования лактата и пирувата;

- цельная кровь, гепарин, 0,2 мг/мл, собирать в посуду из материала, не содержащего свинца, для исследования свинца;

- сыворотка, использовать для сбора промытую кислотой стеклянную посуду, избегать гемолиза, для исследования цинка;

- плазма, ЭДТУК, 2 мг/мл, покручивать пробирку при сборе материала, отцентрифугировать, для исследования ренина.

Условия взятия образца биоматериала могут отрицательно повлиять на аналитические результаты, если не будут приняты во внимание следующие правила.

а) Во избежание влияния суточного ритма, физической активности, принятой пищи пробы крови следует брать в одно и то же время суток, лучше сразу после пробуждения, натощак;

б) При сборе мочи следует строго учитывать сроки сбора, отмечать время начала и окончания сбора;

в) *При взятии крови из вены минимальное время ограничивать отток* крови из конечности;

г) Собирать материал только в заведомо чистую посуду; учитывать требования к материалу, из которого изготовлена посуда;

д) При необходимости сбора крови с антикоагулянтом строго соблюдать требования относительно его состава (гепарин, оксалат, фторид, вид соли гепарина и т.д.) и количества по отношению к объему образца.

е) Строго соблюдать требования по срокам первичной обработки образца (центрифугирование) и его хранения, условиям хранения (температура, контакт с воздухом) и транспортировки в лабораторию.

Правильность регистрации и маркировки взятых образцов

Типичными ошибками в этом отношении являются перепутывание имен пациентов, номеров образцов, назначений анализов. Компьютеризация этих канцелярских процедур снижает частоту таких ошибок, хотя и не устраняет полностью их возможность. Частота ошибок, вызванных перепутыванием пациентов и проб биоматериалов, взятых у них, существенно снижается при использовании наклеиваемых меток со штриховым кодом, присваиваемым пациенту, что требует также наличия аппаратуры для считывания кода. Еще более совершенным способом идентификации проб пациентов является электронная система маркировки спе-

циальных "самоинформирующих" держателей для пробирок, содержащих электронные чипы, в память которых вносится через ручной терминал медперсоналом информация о пациенте и о назначенных ему лабораторных тестах. Будучи помещенным в автоматическую линию пробоподготовки и анализа, держатель пробирки, путем считывания внесенной в него информации, обеспечивает точную реализацию заданной программы и принадлежность полученных результатов исследований пациенту, у которого была взята проба (система "Clids")

И штриховая, и электронная кодировка образцов биоматериала являются компонентами программ обеспечения качества в лабораториях с высокой степенью автоматизации аналитических процессов, которые, как правило, имеют дело со значительным числом проб, и точность идентификации пациентов и их проб в таких лабораториях особенно актуальна.

Сотрудники, участвующие в сборе биоматериала для исследования должны быть исчерпывающе ясно проинструктированы о правилах сбора, хранения и транспортировки проб и точно их соблюдать. Обеспечение качества на внелабораторном преаналитическом этапе может носить характер образовательных и инструктивных мероприятий, а также быть ретроспективным по отношению к выявленным случаям игнорирования клиническим персоналом установленных правил, что привело к ошибочным лабораторным результатам. Недостаточно учтенные врачами факторы биологической и ятрогенной вариации способны создать серьезные затруднения при интерпретации результатов исследований, и в этих случаях контроль на постаналитическом этапе обретает обратную связь с преаналитической фазой.

H.Goldschmidt (1999), характеризуя влияние пост-аналитических факторов на требования к аналитическому качеству, высказал мысль о "петле качества", которая связывает воедино ориентированные на потребности клиницистов процессы, происходящие в 5 фазах : пре-пре-аналитической; пре-аналитической; аналитической; пост-аналитической; пост-пост-аналитической. (первой из них, по-видимому, можно отнести все связанное с подготовкой пациента к исследованию, условиями взятия у него образца или образцов биоматериала, хранением и транспортировкой биоматериала в лабораторию; ко второй - хранение и предварительную обработку образца биоматериала в лаборатории до начала анализа; аналитическая фаза охватывает весь процесс лабораторного анализа пробы биоматериала; пост-аналитическая фаза имеет своим содержанием оценку и интерпретацию результатов анализа в лаборатории; пост-по-

станалитическая фаза представляет собой окончательную интерпретацию результата анализа в клинике с учетом всего объема клинической информации, а также возможных влияний ятрогенных факторов на преаналитическом этапе). Среди источников лабораторных ошибок неправильный запрос на анализ составляет 5%; недостатки взятия образца биоматериала - 40%. Таким образом, недостатки в начальной фазе, зависящей от клинического персонала, существенно влияют на конечный результат, т.е. на полезность лабораторных данных для принятия клинических решений.

Следовательно, качество результатов лабораторной работы зависит не только от самой лаборатории и ее персонала, но и от влияния разнообразных факторов биологического (вариабельность содержания аналитов в организме, своеобразие их свойств), ятрогенного (влияние на содержание аналитов различных диагностических и лечебных процедур, проведенных пациенту перед взятием материала, взаимодействие лечебных и диагностических препаратов в пробе биоматериала с применяемыми при исследовании реагентами), преаналитического (неоптимальность и нестандартность условий сбора образцов биоматериала, их первичной обработки, хранения и транспортировки) характера. Однако, внелабораторная природа этих факторов не означает, что руководители и сотрудники лабораторий могут быть пассивны в их отношении. В каждом медицинском учреждении лабораторные специалисты должны добиваться разработки и утверждения руководителем учреждения правил подготовки пациентов к взятию биоматериалов для лабораторного анализа и правил взятия различных видов биоматериалов, постоянно разъяснять всему персоналу необходимость соблюдения этих правил.

Меры обеспечения качества на аналитическом этапе
Характеристики качества лабораторных исследований

Все вышеупомянутые виды вариации результатов лабораторных исследований проявляются на фоне действия факторов, связанных с проведением самой аналитической процедуры и вызывающих ***аналитическую вариацию***. Поскольку количественное лабораторное исследование является одним из видов измерений, ему присущи аналитические погрешности случайного и систематического характера,. которые сопровождают любое измерение.

Погрешности измерения - это отклонения результатов измерения от истинного значения измеряемой величины. Они могут быть вызваны многообразными причинами : *неправильно приготовленными и плохо* сохранившимися реактивами, калибраторами, неточными пипетками и до-

заторами, грязной посудой; плохо откалиброванными и небрежно содержащимися приборами, частичным переносом содержимого одной пробирки в другую в автоматическом анализаторе, ошибочной адаптацией наборов реактивов к прибору, ошибками в расчете результата из-за использования неправильных коэффициентов; неумением, небрежностью или усталостью лаборантов и т. п.). Систематическая погрешность - составляющая погрешности измерения, остающаяся постоянной или закономерно изменяющаяся при повторных измерениях одной и той же величины и характеризующая правильность измерения, т.е. качество измерений, отражающее близость к нулю систематических погрешностей в их результатах. Постоянный компонент систематической погрешности (Ван) зависит от принципа аналитического метода (его неспецифичности), другой компонент, нестабильный (Δ SE) возникает как результат погрешности калибровки или свойств прибора. Случайная погрешность - это составляющая погрешности измерения, изменяющаяся случайным образом при повторных измерениях одной и той же величины и характеризующая сходимость измерений - качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях (внутрисерийную воспроизводимость) и воспроизводимость измерений - качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполняемых в различных условиях (в различное время, в различных местах, разными методами и средствами; частный случай - межсерийная воспроизводимость, которая определяется применительно к измерениям, выполняемым в одной лаборатории, одним методом. Один компонент случайных погрешностей присущ данному измерению и зависит от оснащенности лаборатории (REизмер), другой возникает благодаря случайным изменениям в процедуре, реактивах, расходных материалах (Δ RE). Поэтому результат количественного лабораторного исследования можно расматривать в виде суммы его математического ожидания (т.е. некоего "истинного значения", которое для компонентов биоматериалов человека остается доподлинно неизвестным) и совокупности случайных и систематических погрешностей, свойственных примененной аналитической процедуре.

Точность измерений - качество измерений, отражающее близость их результатов к истинному значению измеряемой величины (табл. 10).

Таким образом, качество лабораторного анализа характеризуется степенью его погрешностей, количественную оценку которых отражает правильность, воспроизводимость и точность результатов анализа (рис. 4).

Таблица 10

Концепция точности, правильности и воспроизводимости измерения (по ISO/DIS 5725-1 (1990 г.))

Точность измерения	
Выражается через неопределенность измерения	
Правильность измерения	Воспроизводимость измерения
Степень близости среднего значенияизмерений и истинного значения	*Степень близости результатов измерения одного и того же объекта друг с другом*
Систематический компонент погрешности	Случайные компоненты погрешности
Выражается через смещение (bias)	Выражается через стандартное отклонение и коэффициент вариации в % (CV %)

Часть факторов, влияющих на результат исследования, не зависит от лаборатории, поскольку она использует метод, разработанный не в данной лаборатории и основанный на определенном аналитическом принципе с присущими ему свойствами, применяет предписанные протоколом исследования изготовленные промышленным путем оборудование, реагенты, калибраторы. Эти внешние факторы имеют постоянное влияние на результаты анализов.

В своей зоне ответственности – собственно лабораторном анализе – лабораторные специалисты должны наладить и постоянно реализовать систему мер, обеспечивающих:

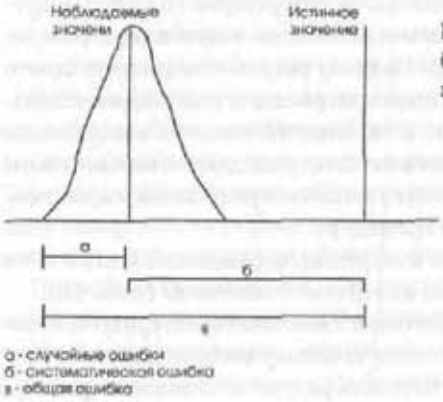


Рис.4. Виды погрешностей (ошибок) измерений в лабораторной аналитике.

а) минимизацию влияний отклоняющих факторов за счет выбора и использования оптимальных аналитических методов; надежно работающего оборудования; реагентов необходимой чистоты; калибраторов, обладающих требуемой степенью прослеживаемости (то-есть, соответствия свойствам первичных стандартных образцов) ; хорошо натренированного и добросовестного персонала и т. п.;

б) постоянное слежение за качеством выполняемых исследований по их результатам;

в) немедленное устранение причин выявленных ошибок.

Успех реализации первой группы мер в значительной мере зависит от того, насколько нужды точности лабораторного анализа включены в общий комплекс общественных нужд и мер их удовлетворения, и насколько эффективно управление качеством лабораторных исследований в системе здравоохранения. Это означает наличие в распоряжении лаборатории информации о существующих методах анализа и их свойствах; доступность достаточно надежных препаративных и аналитических приборов; готовых форм реагентов необходимой степени чистоты; выверенных калибраторов, контрольных материалов и т. п.; наличие референтных лабораторий; системы внешней оценки качества.

В свою очередь и сама лаборатория способна внести свою лепту - переменную составляющую - в вариабильность результатов исследований, в силу тех или иных причин: неточно воспроизводя метод, варьируя оборудование, самостоятельно готовя реактивы, меняя соотношение объемов пробы и реагентов, параметры времени и температуры реакции, используя различные партии реагентов, применяя ненадежный калибратор, и.т.п. (Выраженное влияние на переменный характер подобных влияний может оказать недостаточная выучка и недисциплинированность персонала, несоблюдение протокола исследования, невнимание к сигналам об отклонении результатов от ожидаемых значений и т.д.). Поэтому в клинической лабораторной аналитике выделяют понятие аналитической серии, т.е. совокупности измерений лабораторного показателя, выполненных единовременно в одних и тех же условиях без перенастройки и калибровки прибора. Как правило, аналитическая серия включает исследования калибратора, проб пациентов и проб контрольных материалов, проанализированных в идентичных условиях. Учитывая применение автоматических анализаторов с возможностью случайного доступа, Национальный комитет клинических лабораторных стандартов США (NCCLS) предложил аналитической се-

рией называть период времени или серию измерений, в пределах которых правильность и воспроизводимость исследований остается постоянной. Между сериями возможно различие, которое важно установить как межсерийную вариацию.. Cembrowski, Carey (1989), предложили считать аналитической серией группу проб пациентов и контрольных проб, которая использована для принятия решения о приемлемости результатов исследований проб пациентов.

Следовательно, различают внутрисерийную, краткосрочную случайную вариацию результатов измерений (при использовании стабильных измерительных приборов, допускающих длительные интервалы между калибровками - в течение дня), и межсерийную вариацию, отражающую увеличение влияния отклоняющих факторов - калибровки, изменения реагентов, смены операторов.

Сумма варианс внутри (S_w) - и межсерийной (S_b) вариаций - это общая (S_t) вариация

$S_t^2 = S_w^2 + S_b^2$

Определено, что из общей вариансы аналитического метода 40% выявляется в течение одной аналитической серии, 62% - в течение одного месяца, 97% - в течение полугодия.

ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К МЕТОДАМ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ АНАЛИТИКИ

При рассмотрении лабораторных источников вариации результатов анализов первостепенное значение имеет оценка аналитических свойств применяемых методов исследований. Документ ISO 15189 Международной организации по стандартизации прямо устанавливает, что в ***медицинской лаборатории качество должно быть обеспечено аналитическими процедурами, в том числе, свойствами применяемых методов исследования.***

За примерно два столетия формирования и развития лабораторной медицины было предложено и внедрено в практику огромное количество разнообразных методов исследования. Для исследования некоторых аналитов, особенно тех из них, которые вызывают устойчивый интерес клиницистов (например, глюкоза, холестерин и т. п.) в настоящее время известны уже десятки методов исследования. Со временем стало ясно, что методы могут отличаться не только по своим принципам, но и по ряду свойств, которые могут быть положены в основу своего рода клас-

сификации. В зависимости от сочетания этих свойств метод может быть отнесен к той или иной градации в этой классификации.

Одним из решающих свойств метода является степень его аналитической надежности.

Оценка аналитической надежности клинических лабораторных методов исследования

Оценке аналитической надежности должны подвергаться все методы, рекомендуемые для широкого применения, как вновь разработанные, так и существенно модифицированные. В отличие от системы контроля качества работы лабораторий, которая должна давать ежедневную информацию о качестве получаемых в лаборатории результатов в процессе повседневного использования метода, оценка аналитической надежности метода - процесс, предшествующий использованию метода в практической работе. При оценке надежности метода задача состоит в выявлении погрешностей, зависящих от метода, поэтому важно эту оценку проводить не в одной, а в нескольких точно работающих экспертных (референтных) лабораториях с соблюдением всех указаний по применению метода. Аккредитация таких лабораторий предусмотрена приказом Минздрава России от 05.06. 1996 г. № 233.

Количественные аналитические методы клинических лабораторных исследований разнообразны и используются для определения различных по своим свойствам веществ, поэтому описываемые способы оценки надежности метода могут быть пригодны не для всех методов.

Основными критериями, по которым оценивается метод, являются правильность, воспроизводимость, специфичность, чувствительность, диапазон измерения.

Правильность метода определяется правильностью результатов, полученных этим методом, и зависит от наличия систематических погрешностей метода. Правильность результатов – соответствие среднего значения результатов повторных определений одного и того же материала должной (номинальной) величине. Правильность не имеет числовой величины, она выражается количественной оценкой неправильности, т.е. смещением. Систематическая погрешность метода может быть обусловлена рядом причин: неспецифичностью метода или неправильным способом построения калибровочной кривой, использованием калибровочного материала недостаточной степени чистоты, неправильной постановкой холостой пробы и т. д. Статистическим критерием правильности является степень отклонения средней арифметической (Хсредн.) от долж-

ного (номинального) значения (аналитическое смещение или сдвиг), выраженная в абсолютном значении или в процентах по отношению к должному значению. Правильность метода может быть оценена несколькими способами.

Способ добавки- внесение в биологическую жидкость точно взвешенного количества анализируемого вещества, определение его с помощью исследуемого метода и сопоставление полученного результата с расчетным значением.

Способ смешивания проб –биологическая жидкость с низкой и с высокой концентрацией исследуемого вещества смешивается в различных соотношениях. Процент выявления вещества, равный 90–110, считается удовлетворительным для клинических лабораторных методов.

Способы добавки и смешивания проб (последний может быть применим в методах определения активности ферментов, где невозможно использовать способ добавки) не всегда позволяют определить систематическую погрешность метода. Например, определение по реакции Яффе добавленного количества креатинина дает неправильные результаты за счет низкой специфичности метода.

Исследование контрольного материала с известным содержанием компонентов – наиболее простой способ оценки правильности. Однако он может быть использован только для быстрой ориентировочной оценки правильности метода. Следует иметь в виду, что неточность процедуры приготовления пробы контрольного материала, недостатки условий хранения его, могут в значительной степени изменить истинное содержание компонента в контрольном материале по сравнению со значением, указанным в паспорте материала. Особенно большим изменениям могут подвергаться ферменты.

Наиболее информативным является *способ сравнения методов*, который позволяет определять общую систематическую погрешность метода. Смысл сравнения методов состоит в сравнении результатов, полученных методом-кандидатом (т. е. методом, правильность которого исследуется) и сравнительным методом, который должен давать заведомо правильные результаты. Правильность метода, используемого для сравнения, играет определяющую роль в успешности применения способа сравнения методов. Оптимальным для этих целей является применение референтного метода.

Референтный (эталонный) метод – это метод, обладающий максимальной специфичностью, правильностью и воспроизводимостью результа-

тов определения. Он служит главным образом для сравнения методов при оценке аналитической надежности рутинных методов. Если соответствующий референтный метод недоступен лаборатории, или еще не разработан для определения исследуемого компонента, то в качестве сравнительного может использоваться метод, правильность которого исследована и результаты не дают существенного отклонения от истинных величин.

Для более точной оценки правильности метода-кандидата сравнение методов следует проводить в соответствии с правилами сравнения методов. Эти правила предусматривают точное соблюдение всех письменных указаний по применению метода, проведение исследований под контролем качества с применением единого контрольного материала для гарантии стабильности условий исследования. В сравниваемых методах должны быть проверены точность и линейность калибровочных кривых, по возможности применяться одни и те же реактивы, приборы, работа должна проводиться одними и теми же лаборантами. Правильность метода оценивается на всем диапазоне измеряемых концентраций, поэтому рекомендуется исследовать образцы с низкими, нормальными и повышенными концентрациями вещества. Сравнение методов можно проводить на контрольном материале и на биологическом материале, полученном от больных и здоровых лиц.

Статистическая оценка правильности метода состоит в оценке степени совпадения результатов, полученных методом-кандидатом и сравнительным методом, при этом определяют достоверность различий результатов и наличие статистической связи.

Для определения достоверности различий результатов применяют тест Стьюдента:

$$\frac{x-y}{m_x^2+m_y^2}$$

где X, Y – средние арифметические результатов сравниваемых методов; m – ошибка средней арифметической.

Наиболее достоверные результаты тест Стьюдента дает при нормальном распределении результатов. Поэтому в тех случаях, когда распределение результатов не является нормальным или вид распределения невозможно определить из-за малого числа наблюдений, рекомендуется использовать непараметрические критерии статистики, в частности, кри-

терий знаков, тест Вилкоксона (F. Wilcoxon). Преимуществом непараметрических критериев является их независимость от вида распределения результатов и простота расчета. Критерий знаков эффективен при большом числе определений. Он учитывает не степень различий в каждой паре, а лишь их направленность (знак) и основан на подсчете числа разностей между результатами X и Y со знаком + или –.

Если число наблюдений невелико и критерий знаков не выявил различий, целесообразно применить критерий Т – парный критерий Вилкоксона. Критерий Т более чувствителен, чем критерий знаков. Заключения строят на достигнутом уровне значимости. Для целей лабораторной диагностики достаточен уровень значимости $p = 0,05$. Полученные значения сравнивают с табличными. Если $p < 0,05$, то различия между методом-кандидатом и сравнительным методом достоверны, т. е. метод-кандидат имеет систематическую ошибку. Если $p > 0,05$, то различия на достигнутом уровне значимости недостоверны, т. е. метод-кандидат может быть правильным.

Дальнейшая обработка результатов состоит в оценке статистической связи, для чего можно использовать корреляционный метод и метод регрессии. Корреляция указывает на степень связи двух рядов чисел, т. е. изучается зависимости между результатами X и Y двух методов. Для определения корреляции рассчитывают линейный коэффициент корреляции r и коэффициент ранговой корреляции p, при расчете которого результаты оценивают порядковыми номерами – рангами от меньших результатов к большим. Порядковый номер каждого результата является его рангом.

Формула расчета коэффициента корреляции:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{n}(X - X_0) \times (Y - Y_0)}{\sum_{i=1}^{n}(X - X_0)^2 \times \sum_{i=1}^{n}(Y - Y_0)}$$

где X, Y – результаты отдельных определений; X, Y – средние арифметически каждого ряда определений; (X – X), (Y – Y) – отклонения каждого из определений от средней арифметической.

Формула расчета коэффициента ранговой корреляции:

$$r = 1 - \frac{6 \times \sum_{i=1}^{n} (r_x - r_y)^2}{n(n^2 - 1)}$$

где r_x, r_y – ранги ряда "X", "Y"; n – число пар сравниваемых величин; Σ – знак суммирования.

Коэффициенты корреляции могут колебаться от 0 до +1 при положительной корреляции и от 0 до -1 – при отрицательной корреляции.

При хорошем совпадении результатов сравниваемых методов значение r будет около 1 (0,9—0,99). Чем ниже величина коэффициента корреляции, тем меньше степень совпадения результатов сравниваемых методов. При отсутствии связи между результатами r = 0. Если корреляция отрицательна, при изменении результатов группы X результаты группы Y будут изменяться в противоположном направлении.

Корреляционный метод менее информативен, чем метод регрессии.

Если корреляция указывает на степень связи, то регрессия позволяет определить, как количественно меняется один результат по мере изменения другого. Для построения эмпирической линии регрессии на диаграмму наносят первые результаты в виде точек: на оси абсцисс – сравнительного метода, на оси ординат – метода-кандидата. Диаграмма дает первое представление о типе связи между двумя методами. При линейной регрессии точки располагаются вокруг прямой линии. Если регрессия нелинейная, то требуется дальнейшая доработка метода-кандидата, т. е. он непригоден для целей лабораторной диагностики.

Линейную регрессию рассчитывают по формуле:

$y = a + bx$

где x – результаты сравнительного метода; y – результаты метода-кандидата; a – значение y при x, равном 0; b – коэффициент пропорциональности или регрессии.

Если a статистически отличается от 0, то метод-кандидат имеет систематическую погрешность по отношению к сравнительному методу. Эта ошибка может быть приемлемой и неприемлемой. Подробное обоснование статистических методов - см. в разделе под тем же названием.

Воспроизводимость аналитического метода определяется воспроизводимостью результатов, полученных этим методом. Воспроизводимость результатов – соответствие результатов повторных определений в одном и том же материале. Воспроизводимость не имеет числовой ве-

личины, она определяется степенью разброса результатов. Понятие, обратное воспроизводимости, – разброс результатов, или аналитическая вариация, - зависит от наличия случайных погрешностей и может быть охарактеризовано количественно. В зависимости от условий определения различают аналитическую вариацию в серии, во времени и межлабораторную. Воспроизводимость метода зависит от случайных погрешностей, обусловленных количеством процедур метода (осаждение, центрифугирование, пипетирование), а также стабильностью окрашенного комплекса и другими причинами. Воспроизводимость рассчитывают либо по двум параллельным результатам при исследовании различных образцов, либо по результатам повторных определений на одном и том же контрольном материале в течение не менее10 и 20 дней, следующих друг за другом. Контрольный материал должен быть стабильным в течение всего периода проверки. Можно использовать пригодный слитый биологический материал. Подробное описание способов определения внутрисерийной и общей вариации - см. "Правила внутрилабораторного контроля качества *количественных лабораторных исследований*".

Статистическим показателем разброса результатов является среднеквадратическое отклонение S и относительный показатель разброса результатов — коэффициент вариации CV. Сравнивают аналитическую вариацию метода с помощью F-теста

$$X = \frac{\sum_{I=1}^{n}}{n}; \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{I=1}^{n}(X_I - X)^2}{n-1}};$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{I=1}^{n} d^2}{n}}; \; CV = \frac{S}{X} \times 100\,\%; \; F = \frac{S_1^2}{S_2^2};$$

где X – результат отдельного определения; $\overline{X}$ – средняя арифметическая; Σ – знак суммирования; d – разница между параллельными определениями; *n – число определений*; S – среднеквадратическое отклонение; CV – коэффициент вариации; F – тест оценки вариации методов.

Воспроизводимость определяют на разных уровнях концентрации – нормальном и патологическом. Это позволяет более полно охарактеризовать воспроизводимость метода на всем диапазоне измеряемых кон-

центраций. Чем меньше коэффициент вариации, тем выше воспроизводимость результатов, получаемых тем или иным методом. Такой способ оценки воспроизводимости позволяет объективно оценивать и сравнивать воспроизводимость различных методов.

Аналитическая специфичность метода – способность метода измерять лишь тот компонент или те компоненты, для определения которых он предназначен. Так, высока специфичность ферментативных методов определения тех аналитов, расщепление которых специфически катализирует фермент, используемый в качестве реагента. Применение моноклональных антител обеспечивает высокую специфичность современных иммунохимических методов исследования. Низкая специфичность приводит к получению неправильных результатов и должна быть указана в описании метода. Оценка специфичности не имеет завершения, поскольку многие вещества могут повлиять на результаты.

Для оценки аналитической специфичности следует использовать примеси, которые, исходя из химической структуры, являются репрезентативными представителями тех групп веществ, которые с физиологической точки зрения имеют практическое значение, так как могут содержаться в образцах исследуемых биоматериалов.

Выше уже обсуждалась проблема интерференции, т.е. воздействия на результаты исследований различных веществ, в том числе диагностических или лекарственных средств, вводимых пациенту. Технологическая интерференция обусловлена влиянием веществ на ход реакции. Способ влияния (повышение, понижение) и степень влияния могут быть различными.

Низкая специфичность, интерференция снижают правильность метода. Поэтому предпочтение следует отдавать более специфичным методам и свободным от интерференции. Оценка допустимой степени интерференции, исходя из биологической вариации соответствующих аналитов, приведена в разделе "Выбор критериев аналитической точности".

Аналитическая чувствительность метода определяется его способностью выявлять наименьшие различия между двумя концентрациями исследуемого вещества. В процессе калибровки устанавливается диапазон линейности калибровочной кривой, что является частью аналитической характеристики метода. В диапазоне линейности аналитическая чувствительность определяется наклоном калибровочной кривой.

Нижний предел чувствительности метода – это концентрация исследуемого вещества, которая соответствует наименьшему результату определения, статистически достоверно отличающемуся от показателей

Иерархия аналитических методов и референтных материалов.

Рис.5. Иерархия методов и материалов для клинической лабораторной аналитики

холостой пробы. Нижний предел чувствительности метода может быть охарактеризован количественно. Практически определить нижний предел чувствительности для фотометрических методов можно следующим образом: проводят многократное исследование (не менее 20) холостой пробы и проб с низкой концентрацией анализируемого вещества и устанавливают с заданным уровнем значимости статистически достоверные различия между результатами холостой и опытной проб с низким значением анализируемого вещества, которое и будет количественно соответствовать нижнему пределу чувствительности. Экспериментально установлено что обычно нижний предел чувствительности в фотометрических методах равен среднему значению холостой пробы плюс 3 средних квадратических отклонения ($\bar{X}+3S$).

Иерархия методов

Достижение наивысшей аналитической надежности является целью любой отрасли аналитики. Однако, реальные условия выполнения исследований, характер практических задач, решаемых с помощью аналитики, не могут не влиять на уровень требований, предъявляемых к тем или иным аналитическим процедурам. Это положение определяет и требования к методам клинической лабораторной аналитики.

Наивысшее положение в иерархии методов (рис. 5) по этим признакам занимают так называемые дефинитивные (окончательные, абсолютные) методы. Принципы, лежащие в основе этих методов, позволяют определять тот или иной аналит с наивысшей степенью правильности и специфичности. В качестве примера можно назвать метод изотопного разведения и масс-спектрометрию. Степень отклонения результатов от должной или истинной величины (смещение) составляет от 0, 1% до 1%. Ясно, что характер самой процедуры, высокая стоимость оборудования, малая производительность метода не предполагают использования этих методов для рутинной аналитической работы. Они используются для тестирования и сертификации первичных референтных материалов* и для отработки референтных методов, представляющих вторую ступень в иерархии аналитических методов.

* Первичные референтные материалы - эталоны, стандарты; вторичные референтные материалы - стандартные образцы; рутинные, рабочие референтные материалы - калибраторы.

Методы, обладающие высокими характеристиками правильности (аналитическое смещение от 1 до 3%) и специфичности, могут быть признаны референтными. Они служат ориентиром для всех остальных групп.

Следующую градацию по признаку аналитической надежности могут составить методы стандартные, которые при систематическом использовании стандартных материалов могут применяться в достаточно широком круге лабораторий.

Наиболее обширную группу составляют методы рутинные (повседневные), которые выигрывают по экономико-техническим критериям или по соображениям экономии времени. Оптимальным может стать положение, при котором в качестве рутинных рекомендованы хорошо отобранные, достаточно надежные и экономичные стандартные методы исследования.

Наиболее сложной и ответственной задачей является выбор и согласование референтных методов, задающих тон всей иерархии применяемых на практике методов исследования. Приведем в качестве примера согласованные в 80-х годах экспертами стран Восточной Европы, включая и нашу страну, общие требования к референтным методам и правила их выбора.

Общие требования к референтным методам

Референтный метод – метод, обеспечивающий максимальную аналитическую специфичность и правильность результатов измерения. Как правило, для каждого анализируемого компонента должен быть разработан референтный метод. В зависимости от вида определяемых компонентов различают три группы референтных методов:

1 группа – измерение концентрации точно определяемых молекул, атомов, ионов;

2 группа – измерение концентрации менее точно определяемых молекул, когда молекулярная масса не является точно установленной;

3 группа – измерение активности ферментов.

Цель применения референтных методов:

– Сравнение с другими аналитическими методами при выборе стандартных и рекомендуемых для широкого повседневного применения методов.

Результаты, полученные с помощью референтного метода, позволяют дать оценку отклонениям результатов анализа, полученных с помощью других методов, от наиболее вероятной величины.

– Аттестация контрольных материалов для установления в них наиболее вероятной величины анализируемых компонентов.

– Оценка аналитической надежности готовых аналитических форм наборов реактивов.

– Проведение клинических испытаний нового лабораторного оборудования (измерительные приборы, автоматизированные анализаторы).

- Оценка качества работы клинико-диагностических лабораторий.

Выбор референтного метода должен осуществляться с учетом, главным образом, высоких критериев аналитической надежности. Технико-экономические критерии при этом могут не учитываться.

Референтный метод должен быть точно воспроизведен в соответствии с процедурными спецификациями.

В характеристике референтного метода указываются все спецификации, которые имеют значение для точного воспроизведения метода.

1. Обозначение
2. Наименование
3. Принцип
4. Реактивы
5. Референтный материал
6. Специальное оборудование и приборы
7. Исследуемый или анализируемый материал
8. Ход определения
9. Расчет результатов
10. Построение калибровочной кривой и установление диапазона измерения
11. Оценка аналитической надежности метода
12. Примечания к отдельным спецификациям :

п. 2. Название метода должно быть кратким и ясным с указанием анализируемого компонента, системы.

п. 3. Кратко и точно указывают принцип определения анализируемого компонента, включая применение специальной техники.

п. 4. Указать все реактивы, необходимые для проведения метода, со следующими данными:

4.1. Физико-химические свойства (кристаллизационная вода, относительная молекулярная масса и т.д.).

4.2. Необходимая степень чистоты в соответствии с действующими государственными стандартами. При этом в случае необходимости указываются дополнительные правила испытания. Если в стране нет госу-

дарственного стандарта, то, наряду со степенью чистоты, указывается изготовитель, номер по каталогу и номенклатурный номер.

4.3. Данные о токсичности (класс яда) и канцерогенности в соответствии с законодательством или основными правилами.

4.4. Способ приготовления растворов реактивов и условия их хранения.

4.5. Стабильность растворов реактивов, если она составляет менее трех месяцев.

п.5. Референтные материалы являются основой разработки референтного метода и необходимы для установления его правильности.

п.6. Указываются как отдельные приборы, так и их комплекты с основными параметрами; приводятся данные о проверке годности приборов, подготовке их к работе и калибровке.

п.7. Перечисляются все преданалитические факторы, которые касаются получения, хранения, транспортировки и консервирования исследуемого или анализируемого материала.

п.8. Подробно и точно описывается процесс определения анализируемого компонента, чтобы, по возможности, исключить субъективное толкование отдельных этапов анализа.

п.9. При расчете результатов анализа, в случае необходимости, следует привести используемые формулы. В расчетах используются числа без округлений. Только конечный результат можно округлять до цифры, соответствующей определяемой чувствительности.

п.10. Калибровочные кривые составляются так подробно, как это необходимо в соответствии со специальными требованиями соответствующего метода, с применением подробного статистического анализа. Построение калибровочной кривой должно быть основано на применении соответствующего референтного материала.

п.11. Аналитическая надежность референтного метода характеризуется следующим:

– правильностью,
– воспроизводимостью,
– аналитической чувствительностью,
– аналитической специфичностью,
– нестабильностью метода.

Правильность референтного метода характеризуется соответствием получаемых на его основе результатов (которые являются должными величинами), с наиболее вероятными величинами. Оценка правильности

результатов проводится с помощью референтного материала, соответствующего определяемому компоненту. Отклонение от правильности референтного метода не должно превышать 1% (по другим данным – от 1 до 3%).

Оценка неправильности проводится на трех диапазонах концентрации, которые эквидистантно делят диапазон измерения, т. е. каждый диапазон концентрации составляет по одной трети диапазона измерения. Каждый из этих трех диапазонов концентрации должен иметь величину n, равную по крайней мере 20 (n = 20).

Статистическая обработка результатов проводится при помощи статистических тестов – критерия знаков, t-теста, коэффициента корреляции и анализа линейной регрессии.

Воспроизводимость референтного метода, как и других количественных аналитических методов, характеризуется разбросом получаемых результатов. Для оценки разброса определяют стандартное отклонение в серии (SR), стандартное отклонение во времени (St) и межлабораторное стандартное отклонение. Оценка проводится с проверенными коммерческими контрольными материалами. Разброс результатов, получаемых референтным методом, должен быть минимальным.

Определяют аналитическую чувствительность и аналитическую специфичность.

Матрица не должна влиять на аналитическую специфичность. Влияние других веществ на аналитическую специфичность должно быть минимальным. Референтный метод должен иметь долгосрочную надежность.

п.12. Приводятся все дополнительные данные, которые необходимы для точного выполнения метода.

Разницу в подходе к свойствам методов, имеющих различное предназначение, можно продемонстрировать на примере требований к максимально допустимым отклонениям от должной величины при использовании референтных и рутинных методов (данные по лабораториям ФРГ) (табл. 11).

Правила проведения выбора референтных методов

Порядок выбора референтного метода устанавливается следующим:

1. Проведение научного поиска, анализ литературы, оценка выбранной методологии с учетом научных и аналитических критериев.

2. Оценка аналитической надежности методов-кандидатов не менее, чем в 3 квалифицированных лабораториях.

3. Систематическое сравнение каждого метода-кандидата с международным референтным методом, если имеется такой разработанный метод.

Таблица 11

Максимально допустимые отклонения от должной величины

(в соответствии с правилами Федерального медицинского совета по оценке качества в медицинских лабораториях ФРГ)

Аналит	*Референтные методы*		*Рутинные методы*	
	максим. отклон. (%)	максим. CV (%)	максим. допуст.случ. отклон. (%)	максим. допуст. откл. от должн. велич.(%)
Хлориды	1, 2	1	2	6
Кальций	2	2	3, 3	10
Магний	2, 4	2	4	12
Литий	2, 4	2	4	12
Калий	1, 6	1, 5	2, 7	8
Натрий	1, 2	1	2	6
Холестерин	3	2	6	18
Креатинин	3	2	6	18
Глюкоза	3	2	5	15
Мочевая кислота	3	2	6	18
Триглицериды	3	2	7	21
Альдостерон	4	3	10	30
Кортизол	4	3	11	33
17β-Эстрадиол	4	3	11	33
Прогестерон	4	3	15	45
Тироксин	4	3	8	24
Теофиллин	4	3	8	24

После этого исключаются все методы, которые не соответствуют заданным критериям аналитической надежности.

4. Оптимизация условий измерения (концентрация реактивов, pH реакционной среды, требования к качеству реактивов).

Для методов определения активности ферментов оптимизация условий измерения проводится для:

– концентрации субстрата. Рассчитанная концентрация субстрата проверяется на практике относительно растворимости и светопоглощения;

– концентрации буфера,

– pH;

– концентрации кофакторов и активаторов;

– каталитической концентрации ферментов в индикаторной и во вспомогательных реакциях.

Предпочтительная температура измерения 30°С и 37°С, колебания температуры не должны превышать ±0, 05°С.

Любое изменение вида используемого в методе реактива, его качества и концентрации требует нового испытания метода.

5. Повторное сравнение методов.

6. Рассмотрение группой экспертов предлагаемого варианта метода и его детальное описание.

По данным Рабочей группы европейских экспертов по контролю качества лабораторных исследований (Stockl et al., 1996) в различных европейских странах применяются следующие виды референтных методов (табл.12)

Приводим примеры референтных методов, принятых в ФРГ.

Изотопное разведение – масс-спектрометрия; изотопное разведение – газовая хроматография – масс-спектрометрия – для глюкозы, холестерина, триглицеридов, мочевой кислоты, креатинина, теофиллина, стероидных гормонов, тироксина.

Кулонометрия – для хлоридов.

Пламенно-эмиссионная фотометрия – для натрия, калия.

Атомно-абсорбционная спектрофотометрия – для кальция, магния, лития.

Фотометрия – для общего белка.

Высокопроизводительная жидкостная хроматография – для теофиллина, мочевой кислоты.

Национальный Комитет клинических лабораторных стандартов США на протяжении ряда лет разрабатывает и внедряет дефинитивные и референтные методы. В референтной системе для определений холестерина (Bernert и соавт., 1991) используется в качестве дефинитивного метода : изотопное разведение – газовая хроматография/масс-спектрометрия.

Внутренние стандарты: (3,4 - $^{13}C_2$) холестерин, (25, 26, 27 - $^{13}C_3$) холестерин.

При анализе сертифицированного референтного материала SRM 909 в Национальном институте стандартов аналитическое смещение: 0 (3,66 ммоль/л) ; CV: 0,74%

Референтный метод: Абеля-Кендалла.

При анализе SRM 909 в Центре контроля болезней смещение составило: +1, 6%.

Таблица 12

Референтные методы, применяемые в европейских лабораториях

Аналиты	Принцип метода	Систематическая	Случайная
		погрешность	
Электролиты	Пламенная атомно-эмиссионная-абсорбционная спектрометрия	< 1-2 %	< 1-1,5 %
	Ионная хроматография	< 0,5-1 %	< 1,1-1,5 %
	Кулометрия	< 0,5 %	<1%
Глюкоза	Изотопное разведение- газовая хроматография/масс-спектрометрия	< 1-1,5 %	0,3-1,9 %
Триглицериды	Тот же	< 1-2 %	0,3-2,5 %
	Газовая хроматография	< 1-3,5 %	< 1,5 %
Мочевая кислота	Изотопное разведение- газовая хроматография/ масс-спектрометрия	< 0,3-1 %	0,2-1,4 %
Стероидные гормоны	Тот же	< 2-5 %	0,7-3,5 %
Холестерин	Тот же	< 0,5-5 %	< 0,5 -1,3%
	Колориметрия	< 1,0-1,6 %	< 1,5 %
	Газовая хроматография/ внутренний стандарт	< 0,5 %	< 0,5 %
	ВПЖХ/ Изотопное разведение- масс-спектрометрия	< 1 %	<1%
	Изотопное разведение-газовая хроматография/масс-спектрометрия	<1%	<1%
	Изотопное разведение-жидкостная хроматография/ масс-спектрометрия	+ 0,5 %	<1%
Креатинин	Тот же	+ 0,5 %	0,6-1,2 %
	Изотопное разведение-газовая хроматография/ масс-спектрометрия	< 2,5 % <0,5 % < 0,5 %	3,0 % 0,4-1,1 % < 0,5 %
	ВПЖХ	+2,2-2,2 %	0,2-1,9 %

Правила проведения выбора клинических лабораторных методов при их стандартизации и унификации

Несколько иной акцент имеют критерии выбора методов в качестве стандартных или унифицированных. Приводимые ниже правила также были в 80-е годы согласованы экспертами восточно- европейских стран с участием специалистов из нашей страны.

В клинической лабораторной диагностике для исследуемых компонентов может выбираться подходящий метод с целью его стандартиза-

ции и унификации. При этом следует соблюдать следующие правила:

1. Установление цели медицинского применения с учетом следующих аспектов:

1.1. Область медицинского применения (например, диагностика в экстренных случаях; плановое обследование; специализированное обследование; наблюдение за течением болезни, за результатами лечения).

1.2. Установление диагностических задач с указанием и разъяснением диагностических вопросов, на которые необходимо ответить с помощью лабораторных методов исследования. На основе этого устанавливаются показатели требований к диагностической и аналитической надежности.

2. Принятие решения о стандартизации и унификации клинических лабораторных методов исследований

2.1. Введение стандартного метода предполагает единое в соответствии с данным методом аппаратурное оснащение лабораторий, а также использование единых реактивов и других необходимых материалов со стабильными качествами в течение длительного времени.

3. Выбор метода исследования с целью его стандартизации

3.1. Проведение научного поиска в литературе для выявления всех возможных методов исследования.

3.2. Оценка аналитической надежности методов исследования и отбор тех методов, аналитическая надежность которых соответствует медицинскому назначению.

3.3. Оценка необходимых затрат для выбранных методов с учетом медицинского назначения.

3.4. С помощью выбранных таким образом методов проводится систематическое сравнение методов. После этого отбрасываются все методы, которые не соответствуют заданным критериям аналитической надежности. В случае необходимости проводится оптимизация проведения метода исследования и после этого проводится сравнение методов.

3.5. *Определение диагностической надежности* выбранных методов и исключение тех методов, диагностическая надежность которых не соответствует медицинскому назначению.

3.6. Из оставшихся методов выбирается метод, который связан с наименьшими затратами.

На примерно тех же принципах была основана проводившаяся в нашей стране в 70–80-е годы работа по унификации методов, которая привела к отбору в качестве унифицированных свыше 350 методов исследования, которые практически выполнялись в значительной части лабора-

торий больниц и поликлиник. Избранные в тот период принципы определения многих аналитов до сих пор пользуются популярностью у многих производителей готовых наборов реактивов (табл.13).

Унификация методов лабораторной диагностики в основе своей исходила из принципа оптимизации и дала ряд положительных эффектов: достижение единства согласованных принципов определения значительного числа повседневно исследуемых аналитов, снабжение лаборатории наборами реактивов одинакового качества, сопоставимость результатов, полученных в большинстве лабораторий и т.д. В нынешних условиях децентрализации материального снабжения лабораторий прежние способы унификации методов затруднены, поскольку учреждениями самостоятельно приобретаются наборы реагентов, основанные на совершенно различных принципах определения и сопоставить результаты исследований, произведенных одному и тому же пациенту в различных учреждениях, зачастую невозможно. Разнообразие применяемых методов затрудняет и работу по внешней оценке качества исследований.

Однако, новая экономическая и административная реальность не может отменить потребность лабораторий в стремлении к оптимизации аналитики, а этого невозможно достичь без обеспечения определенного уровня специфичности, правильности, чувствительности, воспроизводимости и других свойств применяемых методов. Этот уровень применительно к одинаковым клинико-диагностическим задачам должен быть примерно равным в различных учреждениях. Поэтому вновь возникла необходимость обратиться к стандартизации методов исследования в соответствии с избранным Минздравом России общим курсом на стандартизацию в здравоохранении.

В масштабах страны должны быть выработаны и настоятельно рекомендованы для следования им единые критерии требований к качествам применяемых методов, что, в свою очередь, должно определять подход к выбору материальных средств анализа – приборов, реактивов, калибраторов; а также к результатам, выявляемым при внешней оценке качества и т.д. Практика ряда исследователей, в том числе экспертов, объединяемых комитетами и рабочими группами Международной Федерации клинической химии, свидетельствуют о том, что применение единого стабильного калибратора позволяет значительно сблизить результаты исследований, основанных на различающихся методических принципах. Все это вместе взятое может составить реальные меры по стандартизации в лабораторной медицине, чему придается важнейшее значение в

Таблица 13

Принципы некоторых унифицированных в 70-80-е годы методов и соответствующие им наборы реактивов отечественных и зарубежных фирм, зарегистрированные в России

Аналит	Принцип унифицированного метода	Фирма-изготовитель набора реактивов	
		Отечественные (название)	Зарубежные (количество)
1. АлАТ	оптимизированный; оптический тест	Диаком-Синтеко	23
2. АсАТ	—«—	—«—	23
3.1. Альбумин	индикатор — бромкрезоловый зеленый	ГосНИИБП, Биоконт	13
3.2. —«—	индикатор — бромкрезоловый пурпуровый	Диаком-Синтеко, Медтех	4
4. Белок общий	биуретовая реакция	Диаком-Синтеко, Биотехнология, ГосНИИБП,Вектор Бест	23
5. Билирубин общий (прямой)	реакция Иендрашика- Грофа	—«—	14
6. Гемоглобин	гемоглобин-цианид	Диаком-Синтеко, РЕНАМ	10
7. Глюкоза	ГОД-ПОД-ПАФ	Диаком-Синтеко, Вектор-Бест, Биоконт, ГосНИМБП Экосервис	22
8. Креатинкиназа	Оптимизированный оптический тест	—	20
9. Гамма-ГТ	гамма-глутамил-паранитроанилид	Диаком-Синтеко	22

стоящее время во всем мире. Эта идеология последовательно воплощается в различных странах как в результате научно-практических разработок специалистов лабораторной медицины, так и под влиянием общественных требований обеспечения интересов пациентов, заинтересованных в точной и экономичной диагностике и лечении заболеваний. Реальное аналитическое содержание деятельности клинико-диагностических лабораторий испытывает эффективное воздействие этих научных и общественных влияний, что приводит к постепенному вытеснению из практики менее специфичных и менее точных методов, а совершенствование производства аналитических приборов и готовых форм реагентов создает все более прочную основу для этой тенденции.

Выбор методов исследования для повседневной работы

Определяющим требованием для выбора метода исследования, применяемого в повседневной работе клинической лаборатории, является соответствие основному клиническому предназначению лабораторного теста, в рамках которого он применяется. Чаще всего такими предназначениями могут быть:

а) плановое обследование в амбулатории или стационаре

б) скрининг с целью обследования группы риска

в) экстренное исследование при критическом состоянии больного (криз, шок, кома и т. п.) в процессе оперативного вмешательства и в послеоперационном периоде. В каждом из этих случаев должны сопоставляться основные свойства метода исследования:

– Информативность
– Надежность
– Своевременность
– Экономичность.

Информативность метода характеризуется его специфичностью и чувствительностью (порогом определения).

Надежность метода выражается в его воспроизводимости, правильности и помехоустойчивости.

Своевременность может быть представлена суммарным расходом времени на выполнение всей аналитической процедуры вплоть до выдачи результата клиницистам.

Экономичность метода определяется стоимостью расходных материалов и оплатой рабочего времени на выполнение анализа.

Баланс этих факторов в сопоставлении с клинической задачей определяет критерии выбора метода. Ясно, что наиболее острым требованием выглядит продолжительность выполнения анализа для диагностики в критических ситуациях. По-видимому, 15 мин – предельный срок для лабораторных процедур – может быть обеспечен так называемыми экспресс-тестами (методы сухой химии на диагностических полосках с объективным чтением результатов в отражательном фотометре) либо внеочередным выполнением исследования на серийном приборе, но за этот же срок. При этом следует иметь в виду, что референтные пределы для экспресс-тестов могут отличаться от таковых для серийных исследований, выполняемых обычным способом "жидкой химии". Кроме того, в условиях экстренного проведения исследования могут быть не учтены необ-

ходимые условия подготовки пациента для предотвращения возможных влияний интерферентов. Тем не менее, требования информативности и аналитической надежности здесь также не могут быть отброшены ввиду крайней важности этой информации для оценки состояния больного и принятия неотложных лечебных мер. Соблюдение экономичности экстренных исследований не представляется существенным в сопоставлении с жизненной важностью получаемой информации.

Скрининговые исследования носят обычно массовый характер, поэтому для них экономичность выступает на первый план наряду с информативностью. Время выполнения исследования не лимитировано, поскольку обычно эти исследования затрагивают амбулаторные контингенты.

Методы для плановых исследований характеризуются прежде всего информативностью и аналитической надежностью, поскольку их результаты используются для подтверждения или уточнения диагноза болезни, для контроля за результатами лечения. Как правило, эти методы относятся к числу основных методов, повседневно используемых в лаборатории. Поэтому экономичность выбранного метода имеет весьма существенное значение.

Приведенные выше рекомендации относительно выбора аналитических методов для той или иной сферы применения основаны преимущественно на опыте оценки методов клинической химии. Следует, естественно, иметь в виду специфические особенности методов, присущих другим разделам лабораторной медицины, например, микробиологии. Тем не менее, общие принципы оценки методов по их чувствительности, специфичности, помехоустойчивости и т.п. можно считать универсальными.

Те же соображения лежат в основе отношения к вновь вводимым методическим принципам и их детальным методикам, например, основанным на полимеразной цепной реакции. В любом случае, лаборатория, выбирая из существующего многообразия методов подходящую аналитическую процедуру, должна стремиться к оптимальному сочетанию клинико-информационных, аналитических, технико-экономических свойств выбранной методики.

НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ ПЛАНИРОВАНИЯ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выбор и установление критериев аналитического качества

Как это следует из приведенных выше характеристик различных видов вариации лабораторных результатов, часть вызывающих их факторов неустранимы - пол, возраст, этническая принадлежность. Следовательно, влияние этих факторов должно быть учтено как данное при интерпретации полученных у конкретного обследуемого результатов исследования. Другие биологические факторы - физическая активность, положение тела, прием пищи, время суток, когда собирается биоматериал для исследования - должны также быть учтены, а еще лучше - стандартизованы, для того, чтобы их влияние было как бы равновеликим при проведении исследований у разных людей или у одного и того же обследуемого в разные дни, т.е. вносило бы по возможности одинаковую долю в общую вариацию результатов исследований. Что же касается факторов, влияющих на саму аналитическую процедуру и вызывающих аналитическую вариацию, то они связаны с различными этапами аналитической процедуры, их влияние может носить систематический или случайный характер, быть кратковременным или постоянным.

Усилия, связанные с повышением аналитической надежности результатов лабораторных исследований, направлены не только на улучшение их аналитических качеств, но и на повышение диагностической информативности лабораторных тестов. В этом основной смысл работы, которая проводится в области лабораторной аналитики. Лаборатория обязана не только регистрировать степень погрешности в своей аналитической работе, но и оценивать, допустим ли размер этой погрешности. Необходимый уровень точности, соответствующий клиническим целям, или допустимый предел погрешности результатов лабораторных исследований, должен быть установлен на научной основе, с учетом как клинических потребностей, так и современных аналитических возможностей. Было бы неправильно и экономически не оправдано стремиться к необоснованной наибольшей точности результатов лабораторных исследований.

Принципы определения допустимых погрешностей результатов лабораторных исследований

Поскольку все лабораторные исследования обладают той или иной степенью аналитической вариации, то и референтные величины, или данные о биологической вариации, и результаты исследований у обследуемых пациентов, полученные с помощью определенных аналитических процедур, имеют некоторую степень погрешности, обусловленную аналитической вариацией. Поэтому для уверенного суждения об отличии или отсутствии отличий результатов исследований, проведенных на биоматериалах пациентов, от референтных величин, лабораторный специалист должен иметь четкое представление о реальной погрешности использованной им аналитической процедуры и мере ее допустимости с учетом поставленной перед ним клинико-диагностической задачи.

Факторы аналитической вариации достаточно хорошо изучены метрологией, то-есть наукой об измерениях, методах и средствах обеспечения их единства и способах достижения требуемой точности. Клинические лабораторные исследования также могут рассматриваться с этих позиций, поскольку в большинстве случаев их задачей является установление количественного содержания тех или иных компонентов в пробах биоматериалов пациентов (с тем замечанием, что, строго говоря, измеряются не сами компоненты, а некоторые физические проявления наличия в пробе биоматериала искомого компонента, возникающие после обусловленных аналитической процедурой воздействий на этот материал, содержащий помимо искомого компонента значительное число других компонентов, способных, в той или иной мере, влиять на анализ искомого компонента). Однако, как это видно из вышеизложенного, состав биоматериала непостоянен, является переменной величиной, и поэтому для уверенного ответа на вопрос о соответствии найденного количества исследуемого компонента в пробе с физиологически оправданным его содержанием необходимо иметь представление о параметрах биологически обусловленных колебаний этого компонента и сопоставить с ними точность анализа, т.е. степень близости результатов аналитической процедуры к истинному значению измеряемой величины. (Высокая точность измерений соответствует малым погрешностям всех видов, как систематических, так и случайных). Впервые на полезность такого сопоставления обратил внимание Tonks (1963), который предложил оценивать аналитическую точность по сравнению с интервалом "нормы", т.е., по современным представлениям, с референтным интервалом, который, в конечном счете, зависит от биологической вариа-

ции. (Правда, следует иметь в виду, что в ту пору определение "нормы" не основывалось на каких-то жестких правилах и в значительной мере отражало мнение лабораторных экспертов и их практический опыт).

В мировой литературе уже более тридцати лет обсуждаются различные подходы к выбору критериев точности клинических лабораторных исследований. Их можно разделить на несколько групп.

К одной их них относятся предложения исходить из **реально достигаемой** в лабораториях **аналитической точности** (Barnett, 1989). Этот подход был положен в основу требований "Clinical Laboratory Improvement Amendments" (CLIA - 88), т.е. закона США о точности лабораторных исследований. В результате проведенных Колледжем американских патологов наблюдений за результатами межлабораторного контроля качества был декретирован допустимый уровень общей погрешности лабораторного анализа для наиболее часто исследуемых аналитов (Общая ошибка, TE). Ее расчет основывается на следующей зависимости :

TEa = biasmeas + дельтаSEcont + Smeas + Z дельтаREcont + Smeas,

где: TEa – допустимая общая ошибка

biasmeas – отклонение аналитического измерения (стабильная неправильность)

дельтаSEcont – изменение систематической ошибки (нестабильная неправильность), определяемое путем контроля качества с избранной вероятностью ошибки определения

Smeas – стандартное отклонение аналитического измерения (стабильная невоспроизводимость)

Z – связано с шансом преизойти критерий общей ошибки или уровень максимального дефекта

дельтаREcont – изменение случайной ошибки (нестабильная невоспроизводимость), определяемое при контроле качества с избранной вероятностью ошибки определения.

Упрощение формулы для преобразования в критерий внешней оценки качества (proficiency testing), установленный CLIA, дает:

TEpt = biasmeas + дельтаSEcont + Smeas + 1,65 Smeas,

Преобразуя формулу, чтобы описать неправильность как функцию критерия общей ошибки, данных контроля качества и невоспроизводимости метода, получаем:

biasmeas = TEpt - (дельтаSEcont + 1,65) Smeas

Свод требований по качеству выполнения исследований наиболее часто определяемых клиническими лабораториями компонентов биомате-

риалов, выраженных в виде приемлемых интервалов общей ошибки, установленных федеральным законодательством США (CLIA-88) для целей внешней оценки качества (proficiency testing), приведен в таблице14.

В поиске подходящих ориентиров точности и используя предложения американских специалистов, но в то же время принимая во внимание наиболее широко используемые в практике отечественных лабораторий методы исследования, в том числе ранее унифицированные, по которым значительное число лабораторий добивалось рекомендуемых уровней воспроизводимости, сотрудники Научно-методического центра по клинической лабораторной диагностике Минздрава РФ в 1997 г. предложили вариант критериев точности исследований примерно 50 часто исследуемых аналитов, определяемых с помощью рутинных методов (табл. 15). Представлялось, что эти предварительные предложения должны быть впоследствии скорректированы, используя как данные о биологической вариабельности компонентов биоматериалов, так и результаты внешней оценки качества российских лабораторий.

Положительно в этом способе то, что ориентир является результатом работы по внешней оценке качества по общепринятой технологии. Сомнения вызваны тем, что контрольные материалы могут иметь отличия в матриксе от проб пациентов и, кроме того, обрабатываются более тщательно, чем серийные пробы. Наряду с этим, практика показывает, что уровень точности весьма варьирует от лаборатории к лаборатории и от времени до времени. В этих условиях избрание единого уровня точности, даже рассчитанного статистически, становится проблематичным. Кроме того, теряются объективные ориентиры для совершенствования лабораторной работы. Этот принцип приемлем, однако, в том варианте, когда в качестве ориентира принимаются показатели точности, достигнутые в лучших лабораториях, как это предложил в 1975 г. Cresswell, используя как ориентир результат, достигнутый в лучших 20% лабораторий. Этот способ и сейчас европейские эксперты рекомендуют применять в отношении оценки методов исследования тех аналитов, для которых не установлены пределы биологической вариации.

Вторая группа предложений ориентирует на **мнение экспертов- специалистов лабораторной медицины** (Gilbert, 1975). Этот способ состоит в согласовании мнений экспертов, которые учитывают реально достигнутый уровень точности в довольно широком круге лабораторий. Таким способом был согласован в 80-е годы экспертами восточно- европейских стран уровень требований к допустимым пределам аналитичес-

Таблица 14

Свод требований по аналитическому качеству исследований, установленных Законом США (CLIA-88)

Аналит или тест	Приемлемый уровень общей ошибки
Рутинная биохимия	
Азот мочевины	Целевое значение ±0, 71ммоль/л мочевины (2 мг/100 мл азота мочевины) или ±9% (больше)
Альбумин	Целевое значение ±10%
АлАТ	— " — ±20%
Амилаза	— " — ±30%
АсАТ	— " — ±20%
Белок, общий	— " — ±10%
Билирубин, общий	— " — ±6, 84 мкмоль/л (0, 4 мг/100мл) или ± 20%
Газы крови p_{o2}	— " — ±3 SD
Газы крови p_{co2}	— " — ±5 мм рт. ст. или ±8% (больше)
Газы крови pH	— " — ±0,04
Глюкоза	— " — ±0,333 ммоль (6 мг/100 мл) или ± 10%
Железо, общее	— " — ±10%
Калий	— " — ±0,5 ммоль/л
Кальций, общий	— " — ±0,250 ммоль/л (1,0 мг/100мл)
Креатинин	— " — ± 0,265 мкмоль/л (0,3 мг/ 100 мл) или ±15% (больше)
Креатинкиназа	— " — ±30%
Креатинкиназа, изоферменты	МВ повышен (наличие или отсутствие) или целевое значение ±3 SD
ЛДГ	— " — ±20%
ЛДГ, изоферменты	ЛДГ1/ЛДГ2 (+ или -) или цел. значение 30%
Магний	Целевое значение ±25%
Мочевая кислота	— " — ±17%
Натрий	— " — ±4 ммоль/л
Триглицериды	— " — ±25%
Хлориды	— " — ±5%
Холестерин, общий	— " — ±10%
Холестерин, ЛВП	— " — ±30%

Аналит или тест	Приемлемый уровень общей ошибки
Щелочная фосфатаза	Целевое значение ±30%
Эндокринология	
Кортизол	— " — ±25%
Тироксин	— " — ±20% или 12,9 нмоль/л (1,0 мкг/ 100 мл (больше)
Тироксин свободный	— " — ±3 SD
Тироид-стимулирующий гормон	— " — ±3 SD
Трийодтиронин	— " — ±3 SD
T_3, захват	— " — ±3 SD, метод-зависимое
Хорионический гонадотропин человека	— " — ±3SD или (положительный или отрицательный результат)
Гематология	
Гематокрит	— " — ±6%
Гемоглобин	— " — ±7%
Идентификация клетки	90% или больший консенсус по идентификации
Лейкоциты, дифференциация	Целевое значение ±3 SD по процентному соотношению различных типов клеток
Лейкоциты, подсчет	Целевое значение ±15%
Протромбиновое время	— " — ±15%
Тромбоциты, подсчет	— " — ±25 %
Фибриноген	— " — ±20%
Частичное тромбопластиновое время	— " — ±15%
Эритроциты, подсчет	— " — ±6%
Общая иммунология	
Антистрептолизин О	— " — ±2 разведения или (полож. или отриц.)
альфа$_1$- антитрипсин	— " — ±3SD
Антитела к вирусу иммунодефицита человека	Реакция или отсутствие реакции
Антиядерные антитела	Целевое значение ±2 разведения или (полож. или отриц.)
Гепатиты (HBsAg, анти-HBc, HBeAg)	Реакция (полож.) или нет реакции (отриц.)

Аналит или тест	Приемлемый уровень общей ошибки	
Иммуноглобулин А	Целевое значение ±3 SD	
Иммуноглобулин Е	Целевое значение ±3 SD	
Иммуноглобулин G	— " —	±25%
Иммуноглобулин М	— " —	±3 SD
Инфекционный мононуклеоз	— " —	±2 разведения или (полож. или отриц.)
Комплемент С3	— " —	±3 SD
Комплемент С4	— " —	±3 SD
Краснуха	— " —	±2 разведения или (полож. или отриц.)
Ревматоидный фактор	— " —	±2 разведения или (полож. или отриц)
альфа-Фетопротеин	— " —	±3 SD
Токсикология		
Алкоголь, кровь	— " —	±25%
Вальпроевая кислота	— " —	±25%
Гентамицин	— " —	±25%
Дигоксин	— " —	±20% или 0,2 мкг/л (больше)
Карбамазепин	— " —	±25%
Литий	— " —	±0,3 ммоль/л или ±20% (больше)
Примидон	— " —	±25%
Прокаинамид (и метаболит)	— " —	±25%
Свинец (кровь)	— " —	±10% или ±0,019 мкмоль/л (4 мкг/100 мл) (больше)
Теофиллин	— " —	±25%
Тобрамицин	— " —	±25%
Фенитоин	— " —	±25%
Фенобарбитал	— " —	±20%
Хинидин	— " —	±25%
Этосуксимид	— " —	±20%

кой вариации изо дня в день (по коэффициенту вариации изо дня в день) для методов определения 34 биохимических и 4 гематологических аналитов (см. табл. 16).

В данном варианте в известной мере теряется объективная основа для установления единого уровня точности, хотя и учитываются реальные результаты, достигнутые в значительном числе лабораторий. Окончательный выбор критериев ставится в зависимость от подбора самих экспертов и их субъективных представлений. Однако в качестве способа установления требований точности исследований на некоторый период времени экспертная оценка может быть использована. (Таким образом были определены временные нормы точности, утвержденные приказом Минздрава России № 45 от 7.02. 2000 г.)

Предложения третьей группы опираются на **медицинские потребности** в точности лабораторных результатов применительно к диагностике определенных форм патологии (Barnett, 1968; Skendzel et al., 1985; de Verdier et. al., 1993).

В 1968 г. Barnett одним из первых предложил для 16 показателей "медицински значимые коэффициенты вариации" (табл. 17). Основой для их установления было согласованное мнение клиницистов и лабораторных специалистов, т.е. подход был эмпирический.

Этот подход основан на признании необходимости системы ограничителей, характеризующих те пределы отклонений лабораторных результатов, которые допустимы, исходя из учета неизбежных влияний биологических и аналитических факторов вариации и в то же время не мешают принятию правильных клинических решений, основанных на убедительном проявлении патологических вариаций.

В 1977—80 гг. бюро NORDKEM (Объединение специалистов скандинавских стран по вопросам клинической химии) осуществило проект уточнения стандартов аналитического качества с позиций клинической практики, определяя влияние аналитического качества на применимость результатов нескольких избранных тестов в хорошо установленных клинических ситуациях. Во всех случаях при расчете допустимых пределов погрешности метода индивидуально для каждого вещества устанавливаются необходимая точность или допустимые пределы ошибок. Каждое вещество в конечном счете исследуется для определенных клинических целей – установления диагноза, контроля за лечением, обследования здоровых. В зависимости от поставленной цели будут меняться и требования к точности результатов. Поэтому окончательный критерий в оценке

Таблица 15

Рекомендуемые критерии приемлемости для некоторых лабораторных показателей (проект 1997 г.)

Аналит	Допуст. погреш., %	Принцип метода	CV анал.
Гемоглобин крови	± 7	Гемоглобинцианидный	± 2
Эритроциты крови	± 6	а) в автоматич. счетчике б) в камере	± 10
Гематокрит.велич.	± 6	Центрифужный метод	± 3
Тромбоциты крови (подсчет)	± 25	а) в автоматич. счетчике б) в мазке	± 3
Лейкоциты крови (подсчет)	± 15	а) в автоматич. счетчике б) в мазке	± 10
Лейкоцитарная формула или не менее 90% совпад. с ист знач. (эксперт.) в 10 рефер.лабор. *или от средн. всех лабор*	± 3S	а) на автоанализаторе б) в мазке	
Альбумин (сыв., плазма)	± 10	Р-ция с бромкрезол. зел. Р-ция с бромкрезол. пурпур.	± 3 ± 3
АлАТ	± 20	Оптич. тест., кинетич., без пиридоксальфосфата, 37°С	± 7
АсАТ	± 20	Тот же	± 7
ЩФ	± 30	а) Кинетич., субстр. пара-нитрофенилфосфат, АМП-буфер, 30° С б) α-нитрофенилфосфат, ДЭА, 37°С в) п-нитрофенилфосфат, метилглютаминовый буфер, 37° С (Лахема)	± 7 ± 7 ± 7
альфа-Амилаза (сывор., моча)	± 30	а) амилоклвстический, б) мальтогептаозид, 37° С	± 10
Билирубин общ.	±20	Диазометод,	±10
Кальций общ. (сыв.)	± 1 мг/100 мл	Р-ция с крезолфталеин комплексоном	±2
Хлориды (сыв., моча)	±5	а) титрометрия, б) колорим. С роданидом ртути	±3
pO_2 в крови	± 3S от аттест. знач.		
PH крови	±0,04	Потенциометрия	
pCO_2	± 5 мм рт. ст.или 8%		
Холестерин (общий)	±10	Ферментативный: ХОД—ПОД—ПАФ	±7
Креатинкиназа	±30	Оптич. Тест, кинетич., NAC—актив., 37°С	±7
Изоферменты КК МВ	±3S полож. или отриц.	при колич. определ.; при кач. обнаружении	

Аналит	Допуст. погрешн., %	Принцип метода	CV анал.
Креатинин сыв., пл.	± 0,3 мг/100 мл или ±15	Р-ция Яффе	±5
Глюкоза сыв., пл.	±10 или 0,33 ммоль/л или 6,0 мг/100 мл	Ферментативный, ГОД-ПОД-ПАФ	±5
Железо сыв.	±20	а) Р-ция с ферроэином б) Р-ция с батофенантр.	±5
ЛДГ	±20	Оптич.тест, кинетич., 37°С	±7
Литий	± 20 или 0,3 ммоль/л	Ионоселективный	±3,6
Магний общий	±25	а) Титановый желт., б) Ксилиловый голубой	±2
Медь	± 10	Р-ция с батокупроиндисульфонатом	±5
Калий сыв., плазма	± 0,5 ммоль/л	Пламенная фотометрия, Ионоселективный	±2
Натрий сыв., пл.	± 4 ммоль/л	Те же методы	±2
Белок общий	±10	Биуретовый.	±3
Триглицериды	±25	Глицероловсидиза, пероксидаза-ПАФ	±7
Мочевина	или 4,28 мг/100 мл	Уреазный-Бертло, Уреаза-ГМГ	±7
Мочевая кислота	±17	Уриказный — ПОД-ПАЭ	±7
Фосфор неорг.	±7	Р-ция с молибдатом амм.	±5
гамма-ГТ	±20	Субстрат γ-гамма-глутамил-п-нитроанилид	±10
Холинэстераза	±20	Субстрат бутирилтиохолин иодид: кинетический	±7
Тироксин свободный	±3S	ИФА	±8
Тироксин общ.	±20 или1 мкг/100 мл или 12,9 нмоль/л	ИФА	±8
Трийодтиронин	+3		
ТСГ	±3	ИФА	±7
Кортизол	±25	РИА	±7
Адреналин, моча	±20	Флуорометрия,	±7
Норадреналин, моча	±20	Метод тот же	±7
Хорионич. гонадотроп. сыв.	± 3	ИФА	±8
Альбумин, моча	±10	Иммунотурбидиметрия	±5
С-РБ	± 15	Метод тот же	
Компонент комплемента С3	± 3	Метод тот же	
Компонент комплемента С4	+ 3	Метод тот же	

Таблица 16

Допустимые пределы аналитической вариации (предложения группы экспертов восточно-европейских стран)
(воспроизводимость изо дня в день)

Клиническая биохимия			
Аналиты	*CV (%)*	*Аналиты*	*CV (%)*
Адреналин	7	Креатинин	5
Аланинаминотрансфераза	7	Креатинкиназа	7
Альбумин	3	Лактатдегидрогеназа	7
а-Амилаза	10	Лейцинаминопептидаза	10
Аммиак	5	Липиды общие	5
Аспартатаминотрансфераза	7	Магний	2
Белок общий	3	Медь	5
Белковые фракции	8	Мочевая кислота	7
Билирубин	10	Мочевина	7
Глюкоза	5	Натрий	2
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа	8	Норадреналин	7
гамма-Глутамилтранс-пептидаза	10	Триглицериды	7
Железо	5	Фосфор	5
Иммуноглобулины	7	Фосфатаза щелочная	7
Калий	2	Хлор	3
Кальций	2	Холинэстераза	7
Кортизол	7	Холестерин	7
Гематология			
Гемоглобин	2		
Гематокрит	3		
Лейкоциты	10		
Эритроциты	10		

допустимой погрешности должен основываться на определении влияния аналитической вариации на диагностическую информативность результатов анализа, т.е. носить медицинский характер. Медицински допустимые пределы погрешностей в различных клинических ситуациях будут различными; например, при повторном исследовании лабораторного показателя у одного и того же больного медицински допустимые пределы погрешности будут более строгими — они включают внутрииндивидуальную и аналитическую вариации изо дня в день. При диспансеризации здоровых наибольшее значение для разделения нормы и патологии будет иметь межиндивидуальная вариация, при этом медицинские требования к точности могут быть снижены.

Для оценки медицински допустимых пределов погрешностей может быть использован опрос мнений врачей-клиницистов и лабораторных работников. Сотрудниками Научно-методического центра по клинической лабораторной диагностике совместно с большой группой клиницистов в 70—80-е годы определены медицински допустимые пределы ана-

Таблица 17

Допустимый предел ошибки (по Barnett, 1968)

Компонент	*Концентрация*	*Допустимые*	
		S	*CV%*
Альбумин, г%	3,5	0,3	7,1
Билирубин, мг%	1,0	0,2	20,0
-"-	20,0	1,5	7,5
Кальций, мг%	11,0	0,25	2,3
Хлориды, ммоль/л	90	2,0	2,2
-"-	110	2,0	1,8
Холестерин, мг%	240	7,2	3,0
Глюкоза, мг%	50	5,0	10,0
-"-	100	5,0	10,0
Фосфор, мг%	4,5	0,25	5,6
Калий, ммоль/л	3	0,25	8,2
-"-	6	0,25	4,2
Натрий, ммоль/л	150	2,0	1,3
-"-	130	2,0	1,5
Общий белок, г%	7,0	0,3	4,3
Азот мочевины, мг%	27	2,0	7,4
Мочевая кислота, мг%	6,0	0,5	8,7

литической ошибки исследования 17 аналитов при 26 формах патологии. Для этого на основе опроса около 100 клиницистов были установлены диагностически значимые концентрации исследуемых компонентов, отличающиеся от верхнего или нижнего референтного предела у здоровых людей. Значение этого отклонения, рассматриваемое как мера медицински допустимого отклонения, было принято за характеристику медицински допустимого разброса, соответствующую при 95% доверительной вероятности примерно 2S.

При этом использовались следующие соотношения:

$K = q_m - q_p$; где K – значение медицински допустимого отклонения, q_m – значение, рассматриваемое как клинически значимое, q_p – значение соответствующего предела референтного интервала.

$S = K/1{,}96$; где S – среднее квадратическое отклонение, а 1,96 при уровне значимости P=0,05 соответствует односторонней Гауссовой кривой.

$$CV = \frac{S}{(q_m - q_p) \div 2} \times 100\%;$$

где CV – коэффициент вариации.

Так, например, лечащие врачи для определенного вида патологии, например сахарного диабета, устанавливают концентрацию исследуемого компонента (глюкозы) выше верхнего предела референтных ("нормальных") значений, выход результатов исследований за который отражает, по их мнению, наличие патологии (сахарный диабет), например, концентрация глюкозы в сыворотке крови 110 мг/100 мл (18 мг/100 мл — 1 ммоль/л) при верхнем пределе нормы 90 мг/100 мл.

Величина, превышающая верхний предел "нормальных", значений (20 мг/100 мл в нашем примере) является мерой медицински допустимого отклонения. Эту величину можно использовать для расчета медицински допустимого коэффициента вариации и последующего его сравнения с аналитической вариацией, получаемой при определении тех же компонентов. Если 110 мг/100 мл в приведенном примере являются средней величиной (X), полученной на основании ответов лечащих врачей, то 20 мг/100 мл характеризуют медицински допустимый разброс, который при 95% доверительной вероятности можно принять за 2S, следовательно, в приведенном примере S равно 10 мг/100 мл. Отсюда величина медицински допустимой аналитической вариации, выраженной в CV, равна:

$$CV = \frac{10}{110} \times 100 = 9\%$$

Определение медицински допустимых пределов погрешностей позволит в ряде случаев, не добиваясь большей точности, чем она требуется в определенных клинических обстоятельствах, избежать увеличения расходов на проведение анализов.

Полученные данные сопоставлялись с аналитической вариацией, рассчитанной в исследованиях изо дня в день. Сопоставление показало (табл.18), что вариация аналитических результатов, соотнесенная со значением 1/8 референтного интервала и с медицински допустимыми отклонениями, вполне удовлетворительная.

Известны несколько вариантов установления требований к аналитической точности, основанных на медицинских потребностях. Harris (1988) предложил следующий критерий:

$S < R\,[1/80 - (4/5)\,(b/R)^2]^{1/2}$

где: S – среднее квадратическое отклонение, характеризующее невоспроизводимость

R. – референтный интервал

b – отклонение, характеризующее правильность

Предложенная Fraser (1990) зависимость более сложна:

$CVa < (D^2/2Z^2 - CVy^2)^{1/2}$

где: CVa – коэффициент вариации, характеризующий невоспроизводимость

D – % изменения результатов, которые должны быть определены

Z^2– стандартное отклонение, соответствующее вероятности, требуемой для установления изменения

CVy – коэффициент, внутрииндивидуальная биологическая вариация

Казалось бы, этот подход вытекает из самой цели клинических лабораторных исследований - предоставлять клиницистам необходимую им лабораторную информацию. Однако, недостатком подхода, основанного на медицинских требованиях, является субъективность оценок клиницистов, зависимость от опыта эксперта-клинициста. Для адекватного суждения о требуемой аналитической точности клиницист должен располагать комплексом и знаний, и опыта, в том числе не только применительно к предполагаемой у пациента болезни, но и относительно рассматриваемого аналита, представлением об аналитической точности, биологической и преаналитической вариации. При данном подходе крайне

Таблица 18

Медицински допустимая погрешность лабораторных исследований (по ответам клиницистов)

Компонент	Патология	CVмед (%)	CVан	1/8 "норм. интерв"
альфа-Амилаза	Острый панкреатит	39		
	Хронический панкреатит	20		
АсАТ	ИБС	18		
	Острый инфаркт миокарда	30		
АлАТ	Острый вирусный гепатит	43		
	Хронический гепатит	34		
Белок общий	Миеломная болезнь	8,1	2,0	3,3
	Нефротический синдром	5,6		
	Хронический гепатит	4,3		
Били-рубин	Острый гепатит	20,0	5,0	10,2
	Холестаз	25,4		
	Гемолитическая анемия	21,1		
Глюкоза	Диабет	7,5	4,6	6,2
	Острый панкреатит	7,6		
гамма-ГТП	Острый алкогольный гепатит	39		
Калий	Гиперальдостеронизм	8,0		5,2
	Синдром Кушинга	5,2		
	Лечение диуретиками	5,3		
	Хр. почечная недостаточность	3,4		
Креатинин	Остр. почечная недостаточность	14,7	4,4	9,8
	Хр. почечная недостаточность	12,2		
	Гепаторенальный синдром	12,7		
КК	Острый инфаркт миокарда	15		
ЛДГ	Миопатии	17		
Мочевина	Остр. почечная недостаточность	13,5	5,6	13,4
	Хр. почечная недостаточность	12,8		
	Гепаторенальный синдром	10,7		
Натрий	Синдром Конна	5,0		2,3
	Болезнь Аддисона	2,1		
Холесте-рин	Атеросклероз	5,6 2,7		8,8
	Холестаз	9,1		
	Нефротический синдром	10,4		
ХЭ	Токсический гепатит	17		
	Цирроз печени	19		
ЩФ	Билиарный цирроз	40		

трудно установить единую норму точности, так как в зависимости от формы патологии, от стадии болезни, от условий обследования могут существенно различаться требования к точности исследования даже одного и того же аналита. Кроме того, клиницисты, оценивая значимость того или иного изменения лабораторного результата для принятия клинического решения, не могут отделить влияние биологической вариации от собственно аналитической вариации, и в связи с этим их выводы относительно требуемой аналитической точности не могут быть достаточно определенными.

В предпринятом Westgard et al. (1994) сопоставлении медицински обусловленных требований точности (Skendzel et al., 1985) с установленными в США критериями точности в соответствии с CLIA-88 учитывался и интервал клинического решения, т.е. диапазон различия между предельными значениями содержания аналитов, который, по мнению врачей, клинически значим. Было предложено следующее уравнение для соотнесения этого интервала с влиянием преаналитических и аналитических факторов :

$$D\,\mathrm{int} = bias_{spec} + bias_{meas} + \Delta SE_{contSmeas} +$$

$$+ z\sqrt{\frac{S^2_{wsub}}{n_{test}} + \frac{S^2_{bspec}}{n_{test}n_{spec}} + \frac{(\Delta RE_{contSmeas})^2}{n_{test}n_{spec}n_{samp}}}$$

$bias_{spec}$ - смещение пробы; $bias_{meas}$ - стабильное смещение измерения или аналитическая неправильность; ΔSE_{cont} - чувствительность процедуры контроля качества для обнаружения систематической погрешности;S_{meas} - стабильное стандартное отклонение измерения или аналитическая невоспроизводимость; z - максимально допустимый уровень отклонения перед завершением процесса ; S_{wsub} - внутриindивидуальная биологическая вариация; S_{bspec} - вариация между образцами при дозировании пробы; ΔRE_{cont} - чувствительность процедуры контроля в отношении обнаружения случайной погрешности или изменения невоспроизводимости; n_{test} - число выполненных тестов; n_{spec} - число взятых образцов; n_{samp} - число измеренных проб из каждого образца.

Такая модель планирования качества позволяет вычленять из общей вариации возможные влияния биологической вариации и преаналитических факторов, и, тем самым, ограничивать собственно аналитическую вариацию. Поэтому устанавливаемые с ее помощью требования к

Таблица 19

Сравнение приемлемой случайной погрешности, основанной на клинических и аналитических критериях (по Westgard et al., 1994)

Аналит *Единицы*	У ров. Решен.	Медицин. измен. Dint (%)	Вн-инд вариация Swsub (%)	Клин. невос. Smeas (%)	Мед. CV (%)	Анал. невос. Smeas (%)	ТЕрг CLIA
Азот мочев. *мг/л*	180 *400*	100 (56,6) 80 *(20,0)*	12,2	8,7-12,0 *0,0*	18,7 *12,2*	2,2-2,8 *1,8-2,3*	9% или 20 мг/л
AcAT	30	13 (43,3)	10,8	6,5-9,0	26,3		3,9-5,120%
Ед/л	70	20 (28,6)		2,9-4,2	14,3		3,9-5,1
Белок общ. г/л	70	15 (21,4)	3,3	3,8-5,1	8,3		1,9-2,6 10%
Билирубин мг/л	8 150	6 (75,0) 20 (13,3)	18,1	11,2-15,7 0,0	23,4 5,4	9,7-13,0 3,9-5,1	20% или 4мг/л
Гематокрит мл/л	420	50 (11,9)	2,5	1,9-2,6	5,4	1,2-1,5	6%
Гемоглобин г/л	*150*	*12 (8,0)*	*2,4*	*1,1-1,5*	*3,6*	*1,4-1,8*	*7%*
Глюкоза,мг/л	1000	300 (30,0)	12,2	2,7-3,9	11,2	1,9-2,6	10% или 60 мг/л
Железо мкг/л	1500	*500 (33,3)*	*19,8*	*0,2-0,3*	*17,2*	*3,9-5,1*	*20%*
Калий ммоль/л	3,8	0,4 (10,5)	4,9	0,7-1,0	4,8	2,6-3,4	0,5 ммоль/л
Кальций мг/л	85	9 (10,6)	2,0	1,7-2,4	4,8	2,3-3,0	10 мг/л
Креатинин мг/л	10 30	5 (50,0) 5 (16,7)	4,9	9,1-12,4 2,2-3,1	17,2 10,1	5,7-7,7 2,9-3,8	15% или 3 мг/л
Лейкоциты подсчет кл/л	5x109 25x109	1,6x109 (32) 7x109 (28)	15,6	1,7-2,6 0,6-1,0	16,4 14,0	2,9-3,8 2,9-3,8	15%
Натрий ммоль/л	125 135	5 (4,0) 6 (4,4)	*0,8*	*0,7-0,9* 0,7-1,0	*1,7* 2,7	*0,6-0,8* 0,6-0,8	*4ммоль/л*
Протромб. время сек	12,0 20,0	3 (25,0) 5 (25,0)	2,3 2,3	5,1-7,1 5,1-7,1	15,2 15,2	2,9-3,8 2,9-3,8	15%
Тироксин общ. мкг/л	60	20 (33,3)	5,8	5,7-7,6	17,2	3,9-5,1	20% *или* 10 мкг/л
Триглицериды мг/л	1300	600 (46,2)	19,8	3,4-5,5	16,1	4,8-6,4	25%
Холестерин мг/л	2100	700 (33,3)	6,1	5,6-7,6 12,3	12,3	1,9-2,6	10%

Заголовки граф: 1 - Аналиты и единицы измерения; 2- Уровень решения; 3- Медицински значимое изменение концентрации аналита; 4- Внутрииндивидуальная биологическая вариация; 5- Клинически максимально допустимая невоспроизводимость; 6- Медицински применяемый коэффициент вариации (по Skendzel et al, 1985); 7 - Аналитическая *максимально допустимая невоспроизводимость*; 8- Критерии качества при его внешней оценке, установленные законом США CLIA-88.

аналитической точности более жесткие, чем основанные на мнениях медиков. Если влияние преаналитических факторов отсутствует, или исключено из клинической модели планирования качества, то остаются только аналитические факторы и критерием конечного результата становится общая погрешность. При условии, что взят лишь один образец биоматериала, и всего одна проба из него подверглась одному исследованию, общая погрешность может быть рассчитана как сумма стабильного смещения измерения (аналитической неправильности) и способности процедуры контроля качества обнаружить систематическую и случайную погрешность. Значение z при уровне значимости 0, 05 или 5% и односторонней Гауссовой кривой составляет 1, 65. Проведенное при этих условиях сопоставление дало следующие результаты (табл.19)

Приведенные сравнительные данные свидетельствуют о том, что хотя для части аналитов клинические и аналитические критерии совпадают, в *отношении других наблюдается существенное расхождение* в уровне требований. Следовательно, необходимо дальнейшее согласование этих подходов по каждому аналиту, исходя из задачи обеспечения клиники аналитически надежной и *клинически приемлемой лабораторной информацией.*

Работа в этом направлении оказалась весьма полезной, так как она показала, что специфика клинической задачи - диагностика или мониторинг - предъявляет различные требования к правильности и воспроизводимости результатов исследований. Показано (G.Klee, 1999 ; P.H. Petersen, 1999), что относительно небольшое изменение аналитического смещения, например, при определении холестерина, тиреотропного гормона, простатического специфического антигена, значительно меняет референтные пределы и способно существенно повлиять на критерии отбора групп пациентов для принятия лечебных мер в отношении гиперхолестеринемии, гипотиреоза, аденомы предстательной железы.. Для слежения за динамикой состояния пациентов и результатами их лечения наиболее важным параметром качества исследований является высокая воспроизводимость результатов при стабильном аналитическом смещении, так как при этих условиях могут быть надежно уловлены изменения состояния больного.

Заслуживают внимания противоречия и трудности, возникающие при установлении критериев качества исследований ферментов (J.A.Lott, 1999). Так, критерий воспроизводимости, основанный на внутрииндивидуальной биологической вариации, оказывается для некоторых ферментных исследований чрезмерно строгим. С другой стороны, пределы,

основанные на установленных законодательством США (CLIA-88) требованиях, представляются слишком широкими. Выход из этих затруднений - в сотрудничестве с клиницистами для установления биологически обоснованных и клинически приемлемых критериев качества анализов ферментов. Отражением того же стремления при отработке критериев аналитического качества учитывать клиническую значимость размера аналитической погрешности явилось предложение при проведении внешней оценки качества рассылать вместе с контрольным материалом 1-2 описания случаев заболеваний, при диагностике или мониторинге которых используют результаты исследований аналитов, содержащихся в контрольном материале (S.Sandberg, 1999). Участники опроса - клиницисты призваны ответить на вопрос о критическом различии лабораторных результатов, которое убеждает клинициста в необходимости принятия решения о диагнозе, назначении или изменении лечебных мер и т.д. Это предложение о клиническом компоненте внешней оценки качества лабораторных исследований представляется весьма ценным и в российских условиях, так как может способствовать реальному согласованию аргументов лаборатории и клиники относительно уровня точности лабораторной аналитики.

Четвертый подход к установлению критериев точности лабораторных исследований исходит из предложения опираться на **биологически детерминированную вариабельность** аналитов и рассчитывать аналитическую точность для каждого аналита, исходя из этих биологических параметров колебаний.

Использование практически основанного на биологических принципах эталона для сравнения с уровнем аналитической точности метода впервые предложил Tonks в 1963 г. По мнению этого автора, которое получило затем широкую популярность, аналитическая ошибка должна оцениваться по отношению к "нормальным" пределам колебаний значений аналита, которые рассматривались как совокупность аналитической и биологической вариаций. По Tonks, приемлемая ошибка:

Еприемл. = 2CV = (1/4 рефер. интервала / средняя рефер. интервала) x 100,

или коэффициент вариации метода не должен превышать 1/ 8 "нормальных" пределов в процентах от среднего значения "нормы". Преимуществом этого способа было наличие известных лабораториям интервалов для многих величин, простота метода расчета. В числе недостатков – зависимость референтного интервала от воспроизводимости и правиль-

ности метода, использованного для его установления, от состава обследованной группы и от примененного статистического метода.

Порядок определения биологически допустимой аналитической вариации следующий. Прежде всего должна быть установлена аналитическая вариация метода, что позволит реально оценить разброс результатов, получаемых тем или иным методом. Далее величину полученной аналитической вариации сравнивают с биологической вариацией, чтобы определить степень влияния аналитической вариации на биологическую, то-есть, на расширение диапазона нормальных или референтных величин.

Соотношение между различными видами вариации определяется следующим уравнением:

S^2общ = S^2ан + S^2биол

где S^2общ – общая вариация; S^2ан – аналитическая вариация; S^2биол – биологическая вариация.

Как показано выше, биологическая вариация имеет два компонента: внутрииндивидуальную и межиндивидуальную вариации:

S^2биол = S^2межинд + S^2внутриинд

Установлено, что при отношении Sан к Sбиол меньше 0, 4 влияние аналитической вариации на общую будет незначительным. Развивая это направление, Cotlov et al. (1970) предложили считать аналитическую вариабельность лабораторных результатов допустимой, если она меньше, чем половина составной, т.е. суммы внутрииндивидуальной и межиндивидуальной биологической вариабельности.

Аспенская конференция Колледжа американских патологов в 1976 г. рекомендовала следующее:

– аналитические требования могут быть уточнены лишь исходя из нужд лечения пациентов;

– требования по воспроизводимости и правильности методов анализа должны быть столь же строгими, как и стандарты выполнения исследований;

– при скрининге, рассчитанном на выявление больных в группе здоровых, воспроизводимость (CV) должна быть равна или меньше, чем 1/ 2 суммы внутри- и межиндивидуальной вариаций, т.е. CV < (CV^2внутриинд + CV^2межинд) $^{1/2}$, и эта величина должна быть ориентиром для долговременной внутрилабораторной воспроизводимости изо дня в день;

– для индивидуального одиночного или многократного исследования аналитические требования должны соответствовать или быть меньше, чем 1/ 2 внутрииндивидуальной вариации (CV < 1/ 2 CVвнутриинд), что

можно рассматривать как ориентир для краткосрочной внутрилабораторной воспроизводимости;

– главное направление дальнейших исследований статистических взаимоотношений, которые используются при оценке диагностической информации, получаемой на основе результатов лабораторных анализов – это изучение тех физиологических и патофизиологических механизмов, которые вызывают вариацию соответствующего аналита. Эту позицию поддержала и Всемирная ассоциация обществ патологов (1979). Harris (1979) разработал статистические правила для расчета зависимости между аналитической и биологической вариацией.

Накопление опыта установления критериев приемлемости лабораторных результатов позволило сопоставить допустимую на основе применения различных подходов степень точности исследований. На таблице 20 сопоставлены максимально допустимые коэффициенты вариации результатов определения ряда аналитов при использовании критериев, положенных в основу перечисленных подходов. Как видно, внутрииндивидуальная биологическая вариация (графа 2) и жестко контролируемая работа лучших лабораторий (графа 1) приводят к весьма близким критериям точности. Мнения клиницистов (графа 5) ориентируют на довольно либеральные критерии.

Сопоставление биологически обусловленных колебаний содержания компонентов в биоматериалах с размахом колебаний результатов их лабораторных исследований стало рассматриваться как важнейший критерий при оценке допустимых пределов аналитических погрешностей.

Вместе с тем было обращено внимание на необходимость тщательной разработки и выполнения методики определения биологической вариации. Данные о биологической вариации должны получаться при обследовании здоровых людей. В сообщениях об этих обследованиях должны указываться сроки наблюдения, время взятия образцов и другие условия обследования. Было установлено, что образцы, полученные у каждой из когорт обследуемых, должны быть исследованы дважды, а коэффициенты вариации аналитической, внутрииндивидуальной и межиндивидуальной биологических вариаций следует рассчитывать путем гнездного анализа варианс после исключения выпадающих результатов.

Обзоры данных об исследовании биологической вариации за ряд лет (Ross, 1982;Fraser, 1988) позволили заключить, что, в целом, величина биологической вариации мало меняется в зависимости от длительности наблюдения, по крайней мере в сроки до 40 недель; что между результа-

Таблица 20

Максимальный медицински допустимый аналитический коэффициент вариации
(сравнение различных подходов)

Аналиты в сыворотке	*Коэффициенты вариации*					
	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
Белок	1,5	1,4	3,0	3,3	8,3	3,5
Глюкоза	2,1	2,2	5,0	3,0	11,2	5,0
Калий	1,4	2,4	2,7	5,0	4,8	-
Кальций	1,5	0,9	3,3	1,5	4,8	-
Креатинин	2,0	2,2	6,0	6,7	10,1	-
Мочевая кислота	2,2	4,2	6,0	6,3	-	-
Мочевина	2,5	6,3	8,0	10,0	12,2	5,0
Натрий	0,9	0,3	2,0	1,1	1,7	0,9
Неорг. фосфаты	2,2	4,0	5,0	5,0	14,3	5,0
Хлориды	1,2	0,7	2,0	1,5	-	1,0
Холестерин	2, 6	2,7	6,0	6,0	12,3	5,0

Источники :
1. Данные ВО 6 европ. стран (state of the art), 1993
2. Расчет по внутри-инд. биол. вариации, конф. в Аспене, 1975
3. Правила обеспечения качества, Германия, 1988
4. Данные экспертов, Gilbert, 1975
5. Мнения клиницистов, Skendzel et al., 1985
6. Расчет общей ошибки из 1/4 "нормы", Tonks, 1963

тами исследования некоторых аналитов у мужчин и женщин наблюдается статистически значимая разница, однако, эти различия не столь велики, а также, что число обследуемых не оказывает существенного влияния на общие результаты. Вместе с тем, было подчеркнуто, что условия обследования должны исключать возможные влияния преаналитических факторов (например, необходимо для исследования триглицеридов брать кровь только натощак, перед исследованием креатинкиназы исключить физические нагрузки у обследуемых, а кортизол исследовать только у людей, не подвергшихся влиянию стрессорных факторов). Величины биологической вариации, полученные при обследовании групп больных людей, оказались более высокими, чем полученные при обследовании

здоровых, и были признаны не подходящими для установления допустимых пределов аналитической вариации.

Первоначально биологическая вариация предлагалась в качестве ориентира для установления критериев воспроизводимости. Однако, затем были предприняты попытки найти подходы для использования биологической вариации и в качестве основы критериев правильности лабораторных результатов. Gowans et al. (1989) предложили считать, что неправильность результатов (при ничтожной невоспроизводимости) должна быть меньше, чем четверть суммы квадратов коэффициентов внутрииндивидуальной и межиндивидуальной вариации. Этот подход был основан на допущении, что референтные величины распределены по принципу гауссового распределения. Более сложный подход был использован для не-гауссовых распределений референтных величин. (Petersen et al., 1989). Было предложено также (Fuentes -Arderiu et al., 1991) уравнение для расчета предельно допустимой интерференции

$I < CV_{вн\text{-}инд} - (1,96CV_a + SE)$, где I - это интерференция, выраженная в процентах; $CV_{вн\text{-}инд}$ - биологическая внутрииндивидуальная вариация; CV_a - достигнутая аналитическая невоспроизводимость; SE - выраженная в процентах систематическая ошибка (неправильность результата).

В стремлении связать подход, основанный на биологической вариации, с подходом, учитывающим значимость вариабильности результатов исследований при клиническом мониторинге, Fraser et al. (1990) предложили следующую зависимость: $CV < [(D^2 / 2 Z^2) - CV_{вн\text{-}инд}^2]$, где D отражает в процентах изменения в серии результатов, имеющие диагностическое значение; Z зависит от избранной вероятности для клинической значимости, а $CV_{вн\text{-}инд}$ - коэффициент внутрииндивидуальной биологической вариации. При всей кажущейся простоте этого предложения его реализация на практике встречается с трудностями установления значений D и Z.

В последнее время позиция в пользу признания биологической вариации основой для установления критериев аналитической точности возобладала и принята за основу требований в рамках Европейского Союза (Petersen et al., 1996). Лишь в тех случаях, когда биологическая вариабельность не установлена, рекомендовано исходить из точности, достигнутой в 20% лучших лабораторий (state- of - the-art). Опирающиеся на этот подход рекомендации Европейской рабочей группы по контролю качества состоят в следующем :

Максимально допустимая аналитическая невоспроизводимость при незначительном аналитическом сдвиге (смещении), выраженная в коэф-

фициенте вариации, должна составлять: **CVаналитич. < 0, 5 x CVвнутри-инд.**, где

CVвнутри-инд. - биологическая внутри-индивидуальная вариация, определяемая у здоровых людей. Иначе говоря, **аналитическая вариация** не должна превышать **половины размаха внутрииндивидуальной биологической вариации**.

Максимально допустимое аналитическое отклонение или смещение, сдвиг (в %) при незначительной невоспроизводимости должно составлять:

Bias аналитич. < 0, 25 x (CV^2внутри-инд. + CV^2межинд.) $^{1/2}$, где

(CV^2внутри-инд. + CV^2межинд.) $^{1/2}$ - это комбинированная внутрииндивидуальная и межиндивидуальная вариация. Иначе говоря, аналитический сдвиг (смещение) не должен превышать одной четвертой доли групповой биологической вариации.

Максимально допустимая систематическая погрешность при незначительной невоспроизводимости составляет : **Δ SE < 0, 33 x CVвнутр-инд.**.

Предусматривались некоторые отличия коэффициентов в зависимости от цели исследования :

для диагностики - **B < 0, 25 CV (вн-инд + межинд) ; CV анал < 0, 58 CV (вн-инд + межинд) ;**

для мониторинга - **CV анал < 0, 5 CV вн-инд; дельта SE < 0, 33 CV вн-инд.**

Несмотря на принципиальное согласие с этим подходом, реально в различных странах применяются неодинаковые уровни требований по точности для одних и тех же аналитов. Так, для натрия приемлемая величина ошибки в Дании и Голландии приблизительно 0,9 %, в Бельгии, Швейцарии и Германии - 2,0%, в Финляндии и Хорватии - 3,0%, в США - 4 ммоль/л (< 3%), во Франции - 3,5%, в Польше - 4,0%, в Испании - 6,6 %. По другим аналитам наблюдаются такие же расхождения в национальных требованиях точности. (Brzezinski, 1997)

Следует напомнить, что европейский подход к критериям точности лабораторных исследований в известной степени отличен от принятого в практике лабораторий США. Принятые специалистами США критерии приемлемости результатов лабораторных исследований могут быть суммированы следующим образом (табл.21)

Разница между этими двумя подходами состоит, пожалуй, в том, что европейские эксперты рассматривают воспроизводимость и правильность раздельно, как две самостоятельные характеристики качества процесса лабораторного измерения в сопоставлении с параметрами биологической

Таблица 21

Критерии приемлемости погрешностей исследований в США.

Тип ошибки	*Способ выявления*	*Критерии*
Случайная	Повторные исследования	Smeas <Sa; Smeas < TEa
Пропорциональная	Открытие добавки	$\left[\frac{R-100}{100}\right]X_c < Ba$
Постоянная	Интерференция	$[Bias] < Ba$
Систематическая	Сравнение	$[(a+bx_c)-x_c] < Ba$
Общая	Повторное исследование и сравнение	$2Smeas+[(a+bx_c)-X_c] < TEa$

Smeas – стандартное отклонение в повторных (параллельных) исследованиях
R – средняя величина открытия добавки (в %%) в повторных исследованиях
Sa – стандартное отклонение
Ba – допустимое отклонение
TEa – общая допустимая ошибка
X_c – порог решения (уровень концентрации) при медицинской интерпретации
Bias – отклонение С средняя разница, определяемая при исследовании интерференции
a – интерцепт и b - угол наклона кривой при регрессионном анализе сравнения двух методов

вариации, тогда как американский подход опирается на обобщенную характеристику – общую ошибку на выходе процесса исследования.

Сравнение этих подходов (Westgard, 1994) на примере 23 тестов (табл.22) показало, что примерно для половины из них (альбумин, ЩФ, амилаза, Ca, Cl, креатинин, ЛДГ, литий, Mg, общий белок, тироксин) европейские требования жестче, чем критерии CLIA-88, а для. других 9 тестов (АлАТ, АсАТ, общий билирубин, холестерин, КК, Fe, триглицериды, мочевая кислота, азот мочевины) — наоборот, американские требования были выше. Для двух тестов (глюкоза, K) требования различались при различных уровнях решений. Последнее обстоятельство также существенно, поскольку оно связывает оценку аналитической работы с клинически важным уровнем концентрации исследуемого компонента биоматериала.

Справедливости ради следует признать, что лаборатория, особенно рядовая, на самом деле не в состоянии практически осуществить анализ

при минимальном аналитическом сдвиге или при минимальном разбросе результатов. Однако, для расчетов допустимой общей ошибки и для построения "графиков критериев процесса выполнения исследования" (см. далее) данные по допустимой систематической и случайной погрешностям для каждого аналита необходимы.

Российская рабочая группа "Контроль качества" при подготовке материалов по совершенствованию качества клинических лабораторных исследований в клинико-диагностических лабораториях учреждений здравоохранения России, утвержденных приказом Минздрава России от 07.02.2000 г., предложила в качестве временных норм точности лабораторных исследований предельно допустимые значения аналитических погрешностей (общей аналитической вариации и относительного аналитического смещения), определенные на основе данных биологической вариации, но с учетом данных внешней оценки качества (то-есть, реально достигнутого уровня точности). Иначе говоря, таблица №1 приложения № 3 к упомянутому приказу (см. в данном томе) является плодом комплексной экспертной оценки. Опыт применения этих норм в лабораториях страны даст основания для разработки отраслевого стандарта аналитической точности.

За последние два десятилетия в результате исследований, проведенных в различных странах, накоплен довольно значительный фактический материал относительно размеров биологической вариации многих аналитов (Ross, 1982; Fraser, 1988, 1992). Sebastian-Gambaro et al. (1997), проанализировав данные из 110 публикаций за 1951-1996 гг., составили таблицу сведений о биологической вариации (по медианам коэффициентов внутрииндивидуальной и межиндивидуальной вариации у здоровых людей, определенных в различные временные промежутки) 228 аналитов, относящихся к сферам интересов клинической биохимии, иммунологии, гематологии. На основе этих данных были расчитаны биологически обоснованные ПДЗ, составившие таблицу №2 приложения №3 к приказу МЗ РФ № 45. Этот вид критериев точности исследований должен рассматриваться как реально достижимый значительным числом лабораторий применительно к большей части аналитов при использовании соответствующих современному уровню методов и средств анализа. Однако, поскольку не все лаборатории располагают необходимыми условиями работы на таком уровне, в настоящее время приведенные в упомянутой таблице№ 2 приложения №3 критерии точности могут быть использованы в образовательных целях, а также как ориентир при оцен-

Таблица 22

Сравнение европейских и американских требований к точности методов лабораторных исследований (по Westgard и соавт., 1994)

Компонент, ед. измерения	Уровень решения	Европейские требования(%)		Американские требования	
		Невоспроизводимость	Неправильность	Критерии маст. по США-88 (общая ошибка)	Максим. доп. невоспр.(%)
Азот мочевины, мг/л	120 180 260 – 500	6,3	5,3	5% или 20 мг/л	3,3 – 4,3 2,2 – 2,8 1,8 – 2,3
Альбумин г/л	20 – 52	1,4 (1,8)	1,1 (2,8)	10%	1,9 – 2,6
АлАТ, ЕД/л	60 – 300	13,6	13,6	20%	3,9 – 5,1
Амилаза, Ед/л		350	3,7	6,5 (7,4) 30%	5,7 – 7,7
АсАТ, Ед/л	30 – 300	7,2	6,2	20%	3,9 – 5,1
Белок, общий, г/л	45 – 80	1,4	1,5 (2,8)	10%	1,9 – 2,6
Билирубин общий, мг/л	8 14 25 – 200	11,3	9,8	20 или 4 мг/л	9,7 – 13,0 5,4 – 7,1 3,9 – 5,1
Глюкоза, мг/л	450 800 – 1800	2,2	1,9	10% или 60 мг/л	2,6 – 3,4 1,9 – 2,6
Железо, мг/л	500 – 4000	15,9	8,9	20%	3,9 – 5,1
Калий, ммоль/л	3,0 3,8 4,0 5,8 7,5	2,4	1,6 (4,8)	0,5 ммоль/л	3,2 – 4,3 2,6 – 3,4 2,4 – 3,2 1,7 – 2,2 1,3 – 1,7
Кальций,мг/л	70 85 90 110 135	0,9 (1,5)	0,7(1,8)	1мг/л	2,8 – 3,6 2,3 – 3,0 2,2 – 2,8 1,8 – 2,3 1,4 – 1,9
КК,Ед/л	240	20,7	19,8	30%	5,7 – 7,7
Креатинин, мг/л	10 16 30 – 60	2,2	2,8(4,4)	15% или 3 мг/л	5,7 – 7,7 3,6 – 4,8 2,9 – 3,8
ЛДГ, Ед/л	300	3,9	4,1 (7,8)	20%	3,9 – 5,1
Литий, ммоль/л	0,4 1,5	3,6	4,1	20% или 0,3 ммоль/л	14,5 – 19,3 3,9 – 5,1
Магний, ммоль/л	0,6 – 2,5	1,1 (2,6)	1,6 (2,2)	25%	4,8 – 6,4
Мочевая к-та, мг/л	20 – 80	4,2	4,0 (8,4)	17%	3,3 – 4,3
Натрий, ммоль/л	115 125 – 135 150	0,3 (0,7)	0,2 (0,6)	4 ммоль/л	0,7 – 0,9 0,6 – 0,8 0,5 – 0,7
Тироксин общ, мкг/л	50 – 140	3,4 (4,1)	4,1 (6,8)	20% или 10 мкг/л	3,9 – 5,1
Триглицериды, мг/л	1300–4000	11,5	15,6	25%	4,8 – 6,4
Хлориды, ммоль/л	9 – 112	0,7 (1,0)	0,5 (1,4)	5%	0,9 – 1,3
Холестерин, мг/л	900 – 4000	2,7	4,1	10%	1,9 – 2,6
ЩФ, Ед/л	150 – 400	3,4	6,4	30%	5,7 – 7,7

ке используемых методов, наборов реактивов и получаемых с их помощью результатов. После широкой практической проверки тщательно выверенные, уточненные и дополненные биологически обоснованные критерии точности в последующем могут стать основой требований при аккредитации и сертификации экспертных лабораторий.

Возможности внутрилабораторного планирования качества лабораторных исследований

Введение единых для всех лабораторий страны критериев точности лабораторных исследований, устанавливаемых в директивном порядке, является необходимой мерой, направленной на преодоление сложившегося положения, когда лаборатории, осуществляя внутрилабораторный контроль качества, принимали за желаемые практически любые уровни допускаемых ими аналитических погрешностей.

Более совершенной была бы система, при которой лаборатории, имея единые научно обоснованные ориентиры точности, могли бы в то же время гибко учитывать как реальные свойства отдельных аналитов и существующих методов и средств их исследования, так и особенности клинических задач, решаемых с помощью лабораторных исследований этих аналитов. Приведенные выше сведения о подходах к оценке приемлемости результатов лабораторных исследований позволяют обосновать механизмы планирования качества лабораторных исследований применительно к конкретным условиям деятельности клинической лаборатории и решаемым с ее участием диагностическим и лечебным задачам медицинского учреждения, что может составить содержание последующего этапа совершенствования деятельности лабораторной службы российского здравоохранения. Такое планирование имеет целью рационализировать усилия лаборатории по обеспечению качества исследований с тем, чтобы постоянно поддерживать точность анализов на уровне, отвечающем, с одной стороны, требованиям квалиметрии и удовлетворяющем клиницистов, и, с другой стороны, не вводящем учреждение в неоправданные расходы.

Можно выделить три варианта внутрилабораторного планирования качества лабораторных исследований: а) основанный на применении свойств различных контрольных правил; б) основанный на "графиках критериев выполнения процесса исследования"; в) основанный на использовании дифференцированных биологически обоснованных предельно допустимых значений аналитических погрешностей исследований отдельных аналитов.

а) Рациональный выбор контрольных правил.

Отправной точкой в выработке рациональной политики в области обеспечения качества исследований является выбор оптимального соотношения *вероятности обнаружения погрешности (Ped)*, не позволяющей использовать результаты серии исследований в клинических целях, и *вероятности ложного отбрасывания* серии исследований (Pfr), которые на самом деле могли бы быть признаны выполненными удовлетворительно. Это достигается применением определенных контрольных пределов (т.е. числом среднеквадратичных отклонений по ту и другую сторону от средней арифметической) при определенном числе повторно исследуемых контрольных образцов в контролируемой серии, что формализовано в описанных ниже *контрольных правилах*.

Вероятность обнаружения погрешности, превышающей постоянную погрешность, присущую измерению (RE meas), как это логично предположить, возрастает с увеличением размера погрешности, что отражается в среднеквадратическом отклонении (табл.23), а также с увеличением числа повторно исследованных контрольных образцов в серии (при использовании нескольких контрольных правил), поскольку среднеквадратическое отклонение разброса результатов вокруг данной средней (Xср) равняется частному от деления S (ранее определенного) на корень квадратный из числа повторных контрольных исследований в серии.

Ложным отбрасывание серии исследований признается при условии, что отсутствуют все аналитические погрешности, кроме присущей измерению постоянной погрешности, размер которой может быть измерен в условиях стабильного аналитического процесса. Вероятность ложного отбрасывания серии исследований находится в зависимости от контрольных правил, избранных для оценки качества (табл.24)

Вероятность ложного отбрасывания серии и вероятность обнаружения погрешности связаны функциональной зависимостью. С возрастанием размера погрешности и вероятности ее обнаружения увеличивается и вероятность отбрасывания серии. Эта функциональная зависимость может быть исследована и представлена в графической форме с помощью компьютерного моделирования. (Рис. 6).

Исходя из этих закономерных зависимостей и заданных уровней допустимой погрешности, может быть осуществлено планирование качества исследований и введен компьютерный контроль за соблюдением установленных параметров качества на основе повседневного проведе-

ния контрольных исследований в соответствии с избранным алгоритмом применения контрольных правил.

б) "Графики критериев процесса выполнения исследований".

Формой одновременного учета требований по правильности и воспроизводимости результатов исследований, т.е. допустимых размеров систематической и случайной погрешностей, служат предложенные (Westgard et al., 1991) "графики критериев процесса выполнения исследования" (на языке оригинала "Charts of Operational Process Specifications" или сокращенно "OPSpecs charts"). При построении этих графиков по оси абсцисс откладываются значения допустимой невоспроизводимости (S meas) в %; по оси ординат - значения допустимой неправильности (B an) в %. Элементами программы являются заданная вероятность обнаружения критической систематической погрешности (дельта SE crit) (например, 90% или 50%) и уровень допустимой общей ошибки (TEallow) (соответственно критериям, установленным для данного аналита) при медицински обусловленном интервале клинического решения, т.е. том интервале значений содержания аналита, при котором клиницист должен назначить новые исследования, изменить лечебные меры или предположить иной диагноз. На график наносятся : а/ линия, отражающая максимальную границу стабильности аналитического процесса;

б/ линии, соответствующие контрольным правилам, избранным при планировании уровня качества; в/ точка, характеризующая реально получаемую в лаборатории правильность и воспроизводимость исследования. График сопровождается таблицей, представляющей вероятность ложного отбрасывания серии для применяемых в лаборатории контрольных правил при избранном числе контрольных исследований в серии. Порядок расположения на графике линий, соответствующих опре-

Рис. 6. Вероятность обнаружения систематической погрешности Ped при разных контрольных правилах Xср±ZS. По оси абсцисс - величина систематической погрешности ΔSE выраженная в S (среднеквадратичном отклонении); по оси ординат - вероятность обнаружения систематической погрешности Ped в % для контрольных правил Xср±2S; Xср±3S; Xср±4S.

деленным контрольным правилам (сверху вниз), должен быть тот же, что порядок расположения самих правил в прилагаемой таблице (рис.7).

Описанные выше графики рассматриваются как практическое средство для выбора процедур контроля качества, которые соответствуют возможностям методов исследования и установленным критериям качества. Лаборатория должна определить правильность и воспроизводимость (точнее, неправильность и невоспроизводимость) получаемых ею результатов исследований, нанести эти данные на график OPSpecs и определить, какое из контрольных правил или какая их комбинация выявляют соответствие лабораторных результатов установленным критериям.

График OPSpecs может также быть использован для выявления отклонений в точности исследований при нестабильном аналитическом процессе и для обеспечения качества на аналитическом этапе. 90%-ная вероятность обнаружения систематической погрешности создает идеальные условия для поддержания всего аналитического процесса на необходимом уровне при выполнении соответствующих контрольных правил в

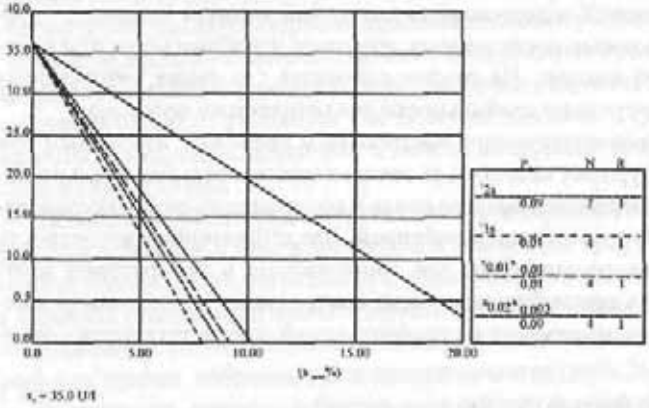


Рис. 7. Пример OPS - карты для планирования качества исследования АлАТ в сыворотке крови (при общей допустимой погрешности T_{allow} 36% и вероятности обнаружения систематической погрешности Ped 90%). По оси абсцисс - допустимая невоспроизводимость Smeas в %; по оси ординат - допустимая неправильность Ban в %; активность АлАТ при выбранной границе решения (x_c) 35 Ед/л. Линии справа налево: первая линия - максимальная граница стабильности аналитического процесса, четыре следующие линии соответствуют контрольным правилам: 1:2S; 1:3S; $X_{0,01}/R_{0,01}$; $X_{0,02}/R_{0,02}$. В таблице справа от графика представлена вероятность ложного отбрасывания аналитических серий для соответствующих контрольных правил и числа контрольных образцов в серии.

Таблица 23

Соотношение размера систематической и случайной погрешности и вероятности ее обнаружения

Контрольное правило дельта SE	*$\bar{X}$ ср± 3S Ped*	*Контрольное правило $\bar{X}$ ср± 2S дельтаRE*	*Ped*
+5	97,5%	4	62%
+4	84%	3	50%
+3	50%	2	32%
+2	16%		
+1	2,5%		

Таблица 24

Зависимость вероятности ложного отбрасывания серии исследований от примененных контрольных правил

(при одном контрольном исследовании)

Контрольные правила	*Вероятность ложного отбрасывания (%)*
$\bar{X}$ ср ± 2S	5
$\bar{X}$ ср ± 2, 575 S	1
$\bar{X}$ ср ± 3 S	0,3
$\bar{X}$ ср ± 3, 5 S	0,05
$\bar{X}$ ср ± 4 S	0,01

каждой серии. При этом требуется ограниченное число контрольных измерений (от 2 до 4), а средняя длина серии, в которой с 90%-ной вероятностью обнаруживается аналитическая ошибка, ARL (average run length) =1/Ped или 1/0, 90 = 1, 1. 50%-ная вероятность обнаружения систематической погрешности может быть приемлемой при стабильном аналитическом процессе, когда частота возникновения отклонений не высока. Если же такую степень обеспечения качества анализов не удается достичь, то необходимо выполнить комплекс мер по проверке всех компонентов аналитического процесса (оборудования, реагентов, калибратора, соблюдения деталей аналитической процедуры) и устранению всех выявленных отклонений от установленных требований.

Графики OPS могут применяться на всех звеньях системы общего управления качеством : в повседневной практике клинических лабора-

торий; при разработке и апробации новых аналитических систем; при оценке деятельности лабораторий в связи с их аккредитацией; для учета влияния правил контроля на реальное качество и стоимость обеспечения лабораторией потребностей клиники.

в) Дифференцированные биологически обоснованные ПДЗ.

Практика применения европейских критериев показала, что для ряда аналитов существующий уровень методологии и техники не позволяет устойчиво обеспечивать приведенные единые параметры точности. В связи с этим было выдвинуто (Fraser, 1997 г.) предложение ориентироваться на три уровня требований по воспроизводимости и правильности рутинных лабораторных исследований : **минимальный, желательный и оптимальный**. В приведенных выше формулах расчета целевых значений общей аналитической вариации и относительного аналитического смещения для этих трех уровней были предложены, соответственно, следующие коэффициенты, на которые надлежит умножать величины биологической вариации : для аналитической вариации - **0,75; 0,5; 0,25**; для аналитического смещения - **0, 375; 0,250; 0,125**.

Приводимая таблица 25 и рисунки 8 и 9 позволяют представить:

1/ зависимость роста вариабильности результатов от величины отношения аналитической невоспроизводимости к внутрииндивидуальной биологической вариации;

2/ зависимость возрастания отклонения результатов за референтные пределы от величины отношения аналитического сдвига к групповой биологической вариации; положительный сдвиг повышает процент результатов за верхним референтным пределом и снижает процент результатов за нижним референтным пределом; отрицательный сдвиг оказывает тот же эффект, но в отношении противоположных референтных границ.

Опыт применения биологически обоснованных критериев точности свидетельствует, что по степени соответствия основному уровню этих требований аналиты, определяемые в повседневной клинической практике, могут быть разделены на три группы. Реально достижимые показатели точности определения большей части аналитов соответствуют требованиям базового уровня ("желательная точность" по Fraser). Это касается, например, активности аланин-аминотрансферазы, щелочной фосфатазы, γ-глютамилтрансферазы, концентрации в сыворотке глюкозы, фосфора, мочевой кислоты, общего билирубина и др.

В другую категорию попадают аналиты, характеристики аналитической точности которых на практике лучше, чем это требуется на базовом

Таблица 25

Варианты
требований по точности и доля прироста вариации лабораторных исследований
(Fraser et al., 1997)

Степень точности	*CVa*	*Прирост аналитич. вариации*	*Ba*	*Доля результатов за рефер. пределами*	
				нижним	*верхним*
Оптимальная	0,25	+ 3%	0,125	1,8%	3,3%
Желательная	0,5	+12%	0,250	1,4%	4,4%
Минимальная	0,75	+25%	0,375	1,0%	5,7%

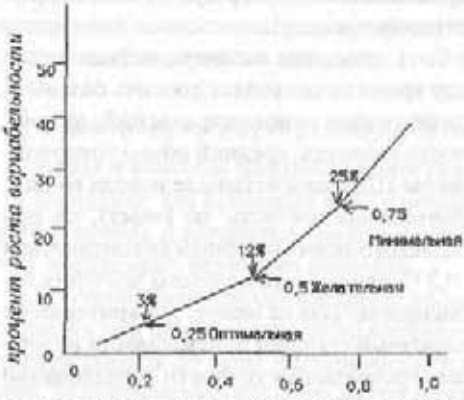


Рис. 8. Зависимость размера увеличения допустимой аналитической вариабельности (выраженной отношением аналитической и внутрииндивидуальной биологической вариации) от трех возможных уровней критериев воспроизводимости, основанных на внутрииндивидуальной биологической вариации (по Fraser et al., 1997).

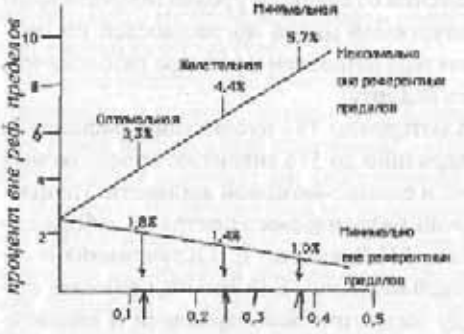


Рис. 9. Зависимость допустимой доли выхода за референтные пределы результатов исследований (выраженной как отношение аналитической и групповой биологической вариации) от трех возможных уровней критериев правильности (по Fraser et al., 1997).

уровне, а в некоторых случаях даже лучше, чем наиболее жесткие критерии, соответствующие требованиям третьего уровня (например, триглицериды, креатинкиназа). При анализе этих компонентов в перспективе целесообразно ориентироваться на целевое значение общей вариации, в формуле для расчета которого использован коэффициент 0,25, а для расчета аналитического смещения использован коэффициент 0,125 (третий уровень, "оптимальная точность" по Fraser) (см. таблицу). Такое повышение точности исследований снижает вариабельность исследований до 3 %, а отклонение результатов от верхнего референтного предела - до 3,3 % и до 1, 8% от нижнего предела. (Указанное отклонение результатов от референтных пределов относится к смещению со знаком плюс, при смещении со знаком минус тот же процент отклонения результатов относится к противоположному референтному пределу).

В третью категорию могут быть отнесены аналиты, методическое обеспечение которых в настоящее время не позволяет достичь базового, второго уровня требований. К этой группе относятся кальций, натрий, хлориды, α-амилаза, осмоляльность своротки, средний объем эритроцита. Для них могут быть предложены ПДЗ, рассчитанные исходя из наименее строгих требований ("минимальная точность" по Fraser), т.е. при коэффициенте 0,75 для расчета целевого значения общей аналитической вариации и при коэффициенте 0,375 для расчета целевого значения относительного аналитического смещения. Тем не менее, эти критерии не следует рассматривать как долгосрочный стандарт приемлемости результатов, поскольку снижение уровня требований к точности исследований ведет к увеличению вариабельности до 25% и к отклонению от верхнего референтного предела до 5,7 % результатов и до 1,0% результатов от нижнего предела. Размер этих отклонений от среднего уровня погрешностей должен быть сопоставлен с допустимой мерой погрешностей по мнению клиницистов (с учетом характера патологии и размера патологического сдвига показателей данного аналита).

Ricos et al. (1999), обобщив материалы 191 публикации, расширили банк данных о биологической вариации до 316 аналитов, определяемых в крови, плазме, сыворотке, моче и спинно-мозговой жидкости. Используя эти данные, сотрудники Научно-методического центра по лабораторной диагностике В.В.Меньшиков, Т.И.Лукичева, Е.В.Кручинкина и сотрудник ГосНИЦ профилактической медицины Е.В.Заикин, применяя статистические зависимости между биологической вариацией и аналитической вариацией, предложенные Европейской рабочей группой EGE-

Lab, а также с помощью математического аппарата для малых выборок (для 10 и 20 аналитических серий) рассчитали три группы или уровня предельно допустимых значений (ПДЗ) аналитических погрешностей результатов лабораторных исследований для обширного перечня аналитов, часто исследуемых в клинических лабораториях: базовый, соответствующий европейским критериям, а также "облегченный" и наиболее строгий. Используя дифференцированные биологически обоснованные ПДЗ (таблица 26), работники лабораторий могут сопоставить с ними получаемые в процессе формирования контрольных карт уровни аналитической точности клинико-лабораторных исследований и в зависимости от свойств аналитов, характеристик существующих методик и наличного оборудования выбирать реально достижимые ориентиры требований повседневной точности исследований, т.е. гибко планировать точность исследований конкретных аналитов.

Контроль качества результатов лабораторных исследований

Виды и способы контроля качества исследований

Выделяют два основных вида контроля качества : внутрилабораторный контроль и внешнюю оценку качества.Для проведения каждого из них предложено несколько способов.

Внутрилабораторный контроль представляет собой систему контрольных мер для повседневного слежения за уровнем точности лабораторной работы по всем выполняемым в лаборатории видам исследований. За полувековую историю контроля качества лабораторных исследований сложилось несколько групп способов контроля, отличающихся наличием или отсутствием контрольного материала, формой и составом контрольного материала, способом расчета и параметрами количественной оценки качества (табл. 27).

Наиболее развернутые программы контроля качества разработаны по отношению к клинико-химическим исследованиям, однако, в настоящее время контрольные программы интенсивно разрабатываются во всех разделах клинической лабораторной медицины.

Контроль по результатам исследований проб биоматериалов пациентов заключается в смысловой оценке значений результатов, полученных в течение дня или при отдельном экстренном исследовании. Оценка может состоять в сопоставлении значения того или иного результата с обычным уровнем значений результатов данного вида исследований (конт-

Таблица 26

Дифференцированные биологически обоснованные критерии точности

		Биол. Вар.		1 уровень, %						2 уровень - базовый, %						3 уровень, %					
		CVi	CVg	Цел. знач.		ПДЗ				Цел. Значение		ПДЗ				Цел. Значен.		ПДЗ			
				CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20
1	Аденозиндеаминаза, активность в сыворотке	11,7	25,5	8,78	10,52	14,39	15,96	12,02	14,36	5,85	7,01	9,59	10,64	8,01	9,58	2,93	3,51	4,80	5,32	4,01	4,79
2	Азот, количество в моче	13,9	24,2	10,43	10,47	17,10	16,93	14,28	15,03	6,95	6,98	11,40	11,29	9,52	10,02	3,48	3,49	5,70	5,64	4,76	5,01
3	Аланинаминотрансфераза, активность в сыворотке	24,3	41,6	18,23	18,07	29,89	29,37	24,97	26,05	12,15	12,04	19,93	19,58	16,65	17,37	6,08	6,02	9,96	9,79	8,32	8,68
4	Альбумин, концентрация в сыворотке	3,1	4,2	2,33	1,96	3,81	3,40	3,19	2,98	1,55	1,31	2,54	2,27	2,12	1,98	0,78	0,65	1,27	1,13	1,06	0,99
	Альбумин, концентрация в утренней моче	36,0	55,0	27,00	24,65	44,28	41,39	36,99	36,48	18,00	16,43	29,52	27,59	24,66	24,32	9,00	8,22	14,76	13,80	12,33	12,16
5	Альдостерон, концентрация в сыворотке	29,4	40,1	22,05	18,65	36,16	32,32	30,21	28,30	14,70	12,43	24,11	21,54	20,14	18,87	7,35	6,22	12,05	10,77	10,07	9,43
	Альдостерон, концентрация в моче, 24 ч.	32,6	39,0	24,45	19,06	40,10	34,22	33,50	29,77	16,30	12,71	26,73	22,81	22,33	19,85	8,15	6,35	13,37	11,41	11,17	9,92
6	α-Амилаза панкреатическая, активность в сыворотке	11,7	29,9	8,78	12,04	14,39	17,48	12,02	15,88	5,85	8,03	9,59	11,65	8,01	10,59	2,93	4,01	4,80	5,83	4,01	5,29
	α—Амилаза, активность в сыворотке	9,5	29,8	7,13	11,73	11,69	16,15	9,76	14,85	4,75	7,82	7,79	10,76	6,51	9,90	2,38	3,91	3,90	5,38	3,25	4,95
	α—Амилаза, активность в случайной порции мочи	94,0	46,0	70,50	39,24	115,62	82,95	96,59	70,12	47,00	26,16	77,08	55,30	64,39	46,75	23,50	13,08	38,54	27,65	32,20	23,37
	α—Амилаза, активность в суточной моче	69,5	52,5	52,13	32,66	85,49	64,98	71,41	55,49	34,75	21,78	56,99	43,32	47,61	37,00	17,38	10,89	28,50	21,66	23,80	18,50
7	Аммиака содержание в суточной моче	24,7	27,3	18,53	13,81	30,38	25,29	25,38	21,92	12,35	9,20	20,25	16,86	16,92	14,61	6,18	4,60	10,13	8,43	8,46	7,31
8	Ангиотензин конвертирующий фермент, активность в сыворотке	12,5	27,7	9,38	11,40	15,38	17,21	12,84	15,50	6,25	7,60	10,25	11,47	8,56	10,33	3,13	3,80	5,13	5,74	4,28	5,17
9	Андростендион, концентрация в сыворотке	11,5	51,1	8,63	19,64	14,15	24,99	11,82	23,42	5,75	13,09	9,43	16,66	7,88	15,61	2,88	6,55	4,72	8,33	3,94	7,81
10	Анизоцитоза эритроцитов показатель в крови	3,5	5,7	2,63	2,51	4,31	4,14	3,60	3,66	1,75	1,67	2,87	2,76	2,40	2,44	0,88	0,84	1,44	1,38	1,20	1,22
11	Антиген СА 19,9 концентрация в сыворотке	24,5	93,0	18,38	36,06	30,14	47,46	25,17	44,11	12,25	24,04	20,09	31,64	16,78	29,41	6,13	12,02	10,05	15,82	8,39	14,70
12	Антиген СА 549	9,1	33,4	6,83	12,98	11,19	17,21	9,35	15,97	4,55	8,65	7,46	11,48	6,23	10,65	2,28	4,33	3,73	5,74	3,12	5,32
13	Антиген СА 125, концентрация в сыворотке	13,6	46,5	10,20	18,17	16,73	24,49	13,97	22,64	6,80	12,11	11,15	16,33	9,32	15,09	3,40	6,06	5,58	8,16	4,66	7,55
14	Антиген СА—15-3, концентрация в сыворотке	5,7	42,9	4,28	16,23	7,01	18,88	5,86	18,10	2,85	10,82	4,67	12,59	3,90	12,07	1,43	5,41	2,34	6,29	1,95	6,03

		Биол. Вар.		1 уровень, %						2 уровень – базовый, %						3 уровень., %					
		Cvi	CVg	Цел. Знач.		ПДЗ				Цел. Значение		ПДЗ				Цел. Значен.		ПДЗ			
				CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20
15	Антиген, ассоциированный с мушиноподобной карциномой, концентрация в сыворотке	10,1	39,3	7,58	15,22	12,42	19,91	10,38	18,53	5,05	10,14	8,28	13,28	6,92	12,36	2,53	5,07	4,14	6,64	3,46	6,18
16	Антитромбин III	5,2	15,3	3,90	6,06	6,40	8,48	5,34	7,77	2,60	4,04	4,26	5,65	3,56	5,18	1,30	2,02	2,13	2,83	1,78	2,59
17	Антихимотрипсин, концентрация в сыворотке	13,5	18,3	10,13	8,53	16,61	14,81	13,87	12,96	6,75	5,69	11,07	9,87	9,25	8,64	3,38	2,84	5,54	4,94	4,62	4,32
18	Аполипопротеин А—1, концентрация в сыворотке	6,5	13,4	4,88	5,58	8,00	8,61	6,68	7,72	3,25	3,72	5,33	5,74	4,45	5,15	1,63	1,86	2,67	2,87	2,23	2,57
19	Аполипопротеин D, концентрация в сыворотке	6,9	22,8	5,18	8,93	8,49	12,14	7,09	11,20	3,45	5,96	5,66	8,09	4,73	7,47	1,73	2,98	2,83	4,05	2,36	3,73
20	Аскорбиновая кислота, концентрация в сыворотке	25,8	22,9	19,35	12,94	31,73	24,93	26,51	21,41	12,90	8,62	21,16	16,62	17,67	14,27	6,45	4,31	10,58	8,31	8,84	7,14
21	Аспартатаминотрансферия, активность в сыворотке	11,9	17,9	8,93	8,06	14,64	13,59	12,23	11,97	5,95	5,37	9,76	9,06	8,15	7,98	2,98	2,69	4,88	4,53	4,08	3,99
22	N—ацетилглюкозаминидаза, количество в утренней моче	42,4	18,2	31,80	17,30	52,15	37,02	43,57	31,23	21,20	11,54	34,77	24,68	29,04	20,82	10,60	5,77	17,38	12,34	14,52	10,41

	N—ацетилглюкозаминидаза, концентрация в утренней моче	52,5	33,5	39,38	23,35	64,58	47,77	53,94	40,60	26,25	15,57	43,05	31,84	35,96	27,07	13,13	7,78	21,53	15,92	17,98	13,53
23	АЧТВ	2,7	8,6	2,03	3,38	3,32	4,64	2,77	4,27	1,35	2,25	2,21	3,09	1,85	2,84	0,68	1,13	1,11	1,55	0,92	1,42
24	Базофилы, подсчет в крови	28,0	54,0	21,00	22,81	34,44	35,83	28,77	32,01	14,00	15,21	22,96	23,89	19,18	21,34	7,00	7,60	11,48	11,94	9,59	10,67
25	Белок общий, гликированный	0,9	11,6	0,68	4,36	1,11	4,78	0,92	4,66	0,45	2,91	0,74	3,19	0,62	3,11	0,23	1,45	0,37	1,59	0,31	1,55
26	Белок общий, концентрация в сыворотке	2,7	4,0	2,03	1,81	3,32	3,07	2,77	2,70	1,35	1,21	2,21	2,04	1,85	1,80	0,68	0,60	1,11	1,02	0,92	0,90
	Белок общий, количество в суточной моче	35,5	23,7	26,63	16,01	43,67	32,51	36,48	27,67	17,75	10,67	29,11	21,68	24,32	18,45	8,88	5,34	14,56	10,84	12,16	9,22
	Белок общий, концентрация в суточной моче	39,6	17,8	29,70	16,28	48,71	34,70	40,69	29,29	19,80	10,85	32,47	23,13	27,13	19,53	9,90	5,43	16,24	11,57	13,56	9,76
	Белок общий, концентрация в утренней моче	48,4	38,1	36,30	23,10	59,53	45,60	49,73	39,00	24,20	15,40	39,69	30,40	33,15	26,00	12,10	7,70	19,84	15,20	16,58	13,00
27	Билирубин , концентрация в сыворотке	25,6	30,5	19,20	14,93	31,49	26,84	26,30	23,34	12,80	9,95	20,99	17,89	17,54	15,56	6,40	4,98	10,50	8,95	8,77	7,78
28	Билирубин связанный, концентрация в сыворотке	36,8	43,2	27,60	21,28	45,26	38,39	37,81	33,37	18,40	14,19	30,18	25,60	25,21	22,25	9,20	7,09	15,09	12,80	12,60	11,12
29	Ванилилминдальная кислота, концентрация в суточной моче	22,2	47,0	16,65	19,49	27,31	29,82	22,81	26,78	11,10	12,99	18,20	19,88	15,21	17,86	5,55	6,50	9,10	9,94	7,60	8,93

		Биол. Вар.		1 уровень, %						2 уровень – базовый, %						3 уровень, %					
		Cvi	CVg	Цел. Знач.		ПДЗ				Цел. Значение		ПДЗ				Цел. Значен.		ПДЗ			
				CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20
30	Вода в плазме	3,3	0,1	2,48	1,24	4,06	2,77	3,39	2,32	1,65	0,83	2,71	1,85	2,26	1,55	0,83	0,41	1,35	0,92	1,13	0,77
31	Гаптоглобин, концентрация в сыворотке	20,4	36,4	15,30	15,65	25,09	25,13	20,96	22,35	10,20	10,43	16,73	16,76	13,97	14,90	5,10	5,22	8,36	8,38	6,99	7,45
32	Гематокрит	2,8	6,4	2,10	2,62	3,44	3,92	2,88	3,54	1,40	1,75	2,30	2,61	1,92	2,36	0,70	0,87	1,15	1,31	0,96	1,18
33	Гемоглобин, концентрация в крови	2,8	6,6	2,10	2,69	3,44	3,99	2,88	3,61	1,40	1,79	2,30	2,66	1,92	2,41	0,70	0,90	1,15	1,33	0,96	1,20
	Гемоглобин, среднее содержание в одном эритроците	1,6	5,2	1,20	2,04	1,97	2,78	1,64	2,57	0,80	1,36	1,31	1,86	1,10	1,71	0,40	0,68	0,66	0,93	0,55	0,86
	Гемоглобин, средняя концентрация в эритроците	1,7	2,8	1,28	1,23	2,09	2,02	1,75	1,79	0,85	0,82	1,39	1,35	1,16	1,19	0,43	0,41	0,70	0,67	0,58	0,60
34	Гидроксипрогестерон -17, концентрация в сыворотке.	19,6	52,4	14,70	20,98	24,11	30,09	20,14	27,42	9,80	13,99	16,07	20,06	13,43	18,28	4,90	6,99	8,04	10,03	6,71	9,14
35	Гликолилированный альбумин, концентрация в сыворотке	5,2	10,3	3,90	4,33	6,40	6,74	5,34	6,04	2,60	2,88	4,26	4,50	3,56	4,02	1,30	1,44	2,13	2,25	1,78	2,01
36	α-1 Глобулин, концентрация в сыворотке	11,4	22,6	8,55	9,49	14,02	14,79	11,71	13,24	5,70	6,33	9,35	9,86	7,81	8,82	2,85	3,16	4,67	4,93	3,90	4,41
37	α-2 Глобулин, концентрация в сыворотке	10,3	12,7	7,73	6,13	12,67	10,92	10,58	9,52	5,15	4,09	8,45	7,28	7,06	6,34	2,58	2,04	4,22	3,64	3,53	3,17
38	Глобулин тироксин связывающий в сыворотке	6,0	6,0	4,50	3,18	7,38	5,97	6,17	5,15	3,00	2,12	4,92	3,98	4,11	3,44	1,50	1,06	2,46	1,99	2,06	1,72
39	Глобулин общий в сыворотке	5,5	12,9	4,13	5,26	6,77	7,82	5,65	7,07	2,75	3,51	4,51	5,21	3,77	4,71	1,38	1,75	2,26	2,61	1,88	2,36
40	Глобулин, связывающий половые гормоны, концентрация в сыворотке	12,1	42,7	9,08	16,64	14,88	22,27	12,43	20,62	6,05	11,10	9,92	14,85	8,29	13,75	3,03	5,55	4,96	7,42	4,14	6,87
41	β- Глобулин, концентрация в сыворотке	10,1	9,1	7,58	5,10	12,42	9,79	10,38	8,42	5,05	3,40	8,28	6,53	6,92	5,61	2,53	1,70	4,14	3,26	3,46	2,81
42	γ- Глобулин, концентрация в сыворотке	14,6	12,3	10,95	7,16	17,96	13,95	15,00	11,96	7,30	4,77	11,97	9,30	10,00	7,97	3,65	2,39	5,99	4,65	5,00	3,99
43	γ-Глутамилтрансфераза, активность в сыворотке	13,8	41,0	10,35	16,22	16,97	22,64	14,18	20,76	6,90	10,82	11,32	15,09	9,45	13,84	3,45	5,41	5,66	7,55	4,73	6,92
44	Глутатион пероксидаза в крови	7,2	21,7	5,40	8,57	8,86	11,92	7,40	10,94	3,60	5,72	5,90	7,95	4,93	7,29	1,80	2,86	2,95	3,97	2,47	3,65
45	Глюкоза, концентрация в сыворотке	6,5	7,7	4,88	3,78	8,00	6,80	6,68	5,91	3,25	2,52	5,33	4,53	4,45	3,94	1,63	1,26	2,67	2,27	2,23	1,97
46	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, активность в эритроцитах	32,8	31,8	24,60	17,13	40,34	32,38	33,70	27,91	16,40	11,42	26,90	21,59	22,47	18,60	8,20	5,71	13,45	10,79	11,23	9,30

		Биол. Вар.		1 уровень, %						2 уровень – базовый, %						3 уровень., %					
		Cvi	CVg	Цел. Знач.		ПДЗ				Цел. Значение		ПДЗ				Цел. Значен.		ПДЗ			
				CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20
47	Гомоцистеин, концентрация в плазме	2,8	6,4	2,10	2,62	3,44	3,92	2,88	3,54	1,40	1,75	2,30	2,61	1,92	2,36	0,70	0,87	1,15	1,31	0,96	1,18
48	Гранулоциты, подсчет в крови	18,3	28,0	13,73	12,54	22,51	21,05	18,80	18,56	9,15	8,36	15,01	14,04	12,54	12,37	4,58	4,18	7,50	7,02	6,27	6,19
49	Двуокись углерода, концентрация газа в крови	4,8	5,3	3,60	2,68	5,90	4,91	4,93	4,26	2,40	1,79	3,94	3,28	3,29	2,84	1,20	0,89	1,97	1,64	1,64	1,42
50	Дегидроэпиандростерон—сульфат, концентрация в сыворотке	3,4	30,0	2,55	11,32	4,18	12,90	3,49	12,44	1,70	7,55	2,79	8,60	2,33	8,29	0,85	3,77	1,39	4,30	1,16	4,15
51	Дезоксикортизол-11, концентрация в сыворотке.	21,3	31,5	15,98	14,26	26,20	24,16	21,89	21,26	10,65	9,51	17,47	16,11	14,59	14,17	5,33	4,75	8,73	8,05	7,30	7,09
52	Дезоксипиридинолин/ креатинин, отношение концентраций в моче	14,7	15,1	11,03	7,90	18,08	14,74	15,10	12,73	7,35	5,27	12,05	9,83	10,07	8,49	3,68	2,63	6,03	4,91	5,03	4,24
53	Дипептидил—пептидаза IV , активность в сыворотке	8,2	14,5	6,15	6,25	10,09	10,06	8,43	8,94	4,10	4,16	6,72	6,71	5,62	5,96	2,05	2,08	3,36	3,35	2,81	2,98
54	Железо, концентрация в сыворотке	26,5	23,2	19,88	13,21	32,60	25,53	27,23	21,91	13,25	8,81	21,73	17,02	18,15	14,61	6,63	4,40	10,87	8,51	9,08	7,30

55	Иммуноглобулин G, концентрация в сыворотке	4,5	16,5	3,38	6,41	5,54	8,51	4,62	7,89	2,25	4,28	3,69	5,67	3,08	5,26	1,13	2,14	1,85	2,84	1,54	2,63
56	Иммуноглобулин A, концентрация в сыворотке	5,0	36,8	3,75	13,93	6,15	16,25	5,14	15,57	2,50	9,28	4,10	10,83	3,43	10,38	1,25	4,64	2,05	5,42	1,71	5,19
57	Иммуноглобулин M, концентрация в сыворотке	5,9	47,3	4,43	17,87	7,26	20,62	6,06	19,81	2,95	11,92	4,84	13,75	4,04	13,21	1,48	5,96	2,42	6,87	2,02	6,60
58	Иммуноглобулинов λ—цепи, концентрация в сыворотке	4,8	18,0	3,60	6,99	5,90	9,22	4,93	8,56	2,40	4,66	3,94	6,15	3,29	5,71	1,20	2,33	1,97	3,07	1,64	2,85
59	Инсулин, концентрация в сыворотке	21,1	58,3	15,83	23,25	25,95	33,06	21,68	30,18	10,55	15,50	17,30	22,04	14,45	20,12	5,28	7,75	8,65	11,02	7,23	10,06
60	Интерферона рецепторы в лейкоцитах крови	14,0	20,0	10,50	9,15	17,22	15,66	14,39	13,75	7,00	6,10	11,48	10,44	9,59	9,17	3,50	3,05	5,74	5,22	4,80	4,58
61	Калий, концентрация в сыворотке	4,8	5,6	3,60	2,77	5,90	5,00	4,93	4,34	2,40	1,84	3,94	3,33	3,29	2,90	1,20	0,92	1,97	1,67	1,64	1,45
	Калий, количество в суточной моче	24,4	22,2	18,30	12,37	30,01	23,72	25,07	20,39	12,20	8,25	20,01	15,81	16,71	13,59	6,10	4,12	10,00	7,91	8,36	6,80
	Калий, концентрация в лейкоцитах	13,6	13,4	10,20	7,16	16,73	13,48	13,97	11,63	6,80	4,77	11,15	8,99	9,32	7,75	3,40	2,39	5,58	4,49	4,66	3,88
	Калий, концентрация в суточной моче	27,1	23,2	20,33	13,38	33,33	25,98	27,85	22,28	13,55	8,92	22,22	17,32	18,56	14,85	6,78	4,46	11,11	8,66	9,28	7,43
62	Кальций, количество в суточной моче	26,2	27,0	19,65	14,11	32,23	26,29	26,92	22,72	13,10	9,41	21,48	17,53	17,95	15,14	6,55	4,70	10,74	8,76	8,97	7,57

		Биол. Вар.		1 уровень, %						2 уровень – базовый, %						3 уровень, %					
		Cvi	CVg	Цел. Знач.		ПДЗ				Цел. Значение		ПДЗ				Цел. Значен.		ПДЗ			
				CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20
	Кальций, концентрация в сыворотке	1,9	2,8	1,43	1,27	2,34	2,15	1,95	1,89	0,95	0,85	1,56	1,43	1,30	1,26	0,48	0,42	0,78	0,72	0,65	0,63
	Кальций, концентрация в суточной моче	27,5	36,6	20,63	17,17	33,83	29,96	28,26	26,20	13,75	11,45	22,55	19,97	18,84	17,47	6,88	5,72	11,28	9,99	9,42	8,73
63	Каппа-цепи иммуноглобулинов, концентрация в сыворотке	4,8	15,3	3,60	6,01	5,90	8,25	4,93	7,59	2,40	4,01	3,94	5,50	3,29	5,06	1,20	2,00	1,97	2,75	1,64	2,53
64	β-Каротин, концентрация в сыворотке	36,0	39,0	27,00	19,90	44,28	36,64	36,99	31,73	18,00	13,27	29,52	24,43	24,66	21,15	9,00	6,63	14,76	12,21	12,33	10,58
65	Катехоламины общие, концентрация в суточной моче	24,0	32,0	18,00	15,00	29,52	26,16	24,66	22,88	12,00	10,00	19,68	17,44	16,44	15,26	6,00	5,00	9,84	8,72	8,22	7,63
66	Кислая фосфатаза, активность в сыворотке	8,9	8,0	6,68	4,49	10,95	8,63	9,14	7,41	4,45	2,99	7,30	5,75	6,10	4,94	2,23	1,50	3,65	2,88	3,05	2,47
67	Кислая фосфатаза костная, активность в сыворотке	10,8	13,3	8,10	6,42	13,28	11,45	11,10	9,97	5,40	4,28	8,86	7,63	7,40	6,65	2,70	2,14	4,43	3,82	3,70	3,32
68	Кислый α-1 гликопротеин	11,3	24,9	8,48	10,25	13,90	15,51	11,61	13,97	5,65	6,84	9,27	10,34	7,74	9,31	2,83	3,42	4,63	5,17	3,87	4,66
69	Компонент комплемента С3, концентрация в сыворотке	5,2	15,6	3,90	6,17	6,40	8,58	5,34	7,87	2,60	4,11	4,26	5,72	3,56	5,25	1,30	2,06	2,13	2,86	1,78	2,62

70	Компонент комплемента С4, концентрация в сыворотке	8,9	33,4	6,68	12,96	10,95	17,10	9,14	15,89	4,45	8,64	7,30	11,40	6,10	10,59	2,23	4,32	3,65	5,70	3,05	5,30
71	Кортизол, концентрация в сыворотке	20,9	45,6	15,68	18,81	25,71	28,53	21,47	25,68	10,45	12,54	17,14	19,02	14,32	17,12	5,23	6,27	8,57	9,51	7,16	8,56
72	Креатинин, концентрация в сыворотке	4,3	12,9	3,23	5,10	5,29	7,10	4,42	6,51	2,15	3,40	3,53	4,73	2,95	4,34	1,08	1,70	1,76	2,37	1,47	2,17
	Креатинин, клиренс	13,6	13,5	10,20	7,19	16,73	13,51	13,97	11,65	6,80	4,79	11,15	9,01	9,32	7,77	3,40	2,40	5,58	4,50	4,66	3,88
	Креатинин, количество в суточной моче	11,0	23,0	8,25	9,56	13,53	14,68	11,30	13,17	5,50	6,37	9,02	9,78	7,54	8,78	2,75	3,19	4,51	4,89	3,77	4,39
	Креатинин, концентрация в суточной моче	24,0	24,5	18,00	12,86	29,52	24,02	24,66	20,75	12,00	8,57	19,68	16,01	16,44	13,83	6,00	4,29	9,84	8,01	8,22	6,92
73	Креатинкиназа, активность в сыворотке	22,8	40,0	17,10	17,27	28,04	27,87	23,43	24,76	11,40	11,51	18,70	18,58	15,62	16,50	5,70	5,76	9,35	9,29	7,81	8,25
	Креатинкиназа, массовая концентрация в сыворотке	18,4	61,2	13,80	23,96	22,63	32,52	18,91	30,01	9,20	15,98	15,09	21,68	12,60	20,01	4,60	7,99	7,54	10,84	6,30	10,00
74	Креатинкиназа—МВ, % в сыворотке	6,9	42,8	5,18	16,26	8,49	19,47	7,09	18,52	3,45	10,84	5,66	12,98	4,73	12,35	1,73	5,42	2,83	6,49	2,36	6,17
	Креатинкиназа—МВ, активность в сыворотке	18,4	61,2	13,80	23,96	22,63	32,52	18,91	30,01	9,20	15,98	15,09	21,68	12,60	20,01	4,60	7,99	7,54	10,84	6,30	10,00

		Биол. Вар.		1 уровень, %						2 уровень – базовый, %						3 уровень, %					
		Cvi	CVg	Цел. Знач.		ПДЗ				Цел. Значение		ПДЗ				Цел. Значен.		ПДЗ			
				CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20
75	Лактат, концентрация в сыворотке	27,2	16,7	20,40	11,97	33,46	24,62	27,95	20,90	13,60	7,98	22,30	16,41	18,63	13,94	6,80	3,99	11,15	8,21	9,32	6,97
76	Лактатдегидрогеназа, активность в сыворотке	6,6	14,7	4,95	6,04	8,12	9,11	6,78	8,21	3,30	4,03	5,41	6,07	4,52	5,47	1,65	2,01	2,71	3,04	2,26	2,74
77	Лактатдегидрогеназа—1, активность в сыворотке	6,3	10,2	4,73	4,50	7,75	7,43	6,47	6,57	3,15	3,00	5,17	4,95	4,32	4,38	1,58	1,50	2,58	2,48	2,16	2,19
78	Лактатдегидрогеназа—2, активность в сыворотке	4,9	4,3	3,68	2,44	6,03	4,72	5,03	4,05	2,45	1,63	4,02	3,15	3,36	2,70	1,23	0,81	2,01	1,57	1,68	1,35
79	Лактатдегидрогеназа—3, активность в сыворотке	4,8	5,5	3,60	2,74	5,90	4,97	4,93	4,31	2,40	1,83	3,94	3,31	3,29	2,88	1,20	0,91	1,97	1,66	1,64	1,44
80	Лактатдегидрогеназа—4, активность в сыворотке	9,4	9,0	7,05	4,88	11,56	9,25	9,66	7,97	4,70	3,25	7,71	6,17	6,44	5,31	2,35	1,63	3,85	3,08	3,22	2,66
81	Лактатдегидрогеназа—5, активность в сыворотке	12,4	13,4	9,30	6,85	15,25	12,61	12,74	10,92	6,20	4,56	10,17	8,41	8,49	7,28	3,10	2,28	5,08	4,20	4,25	3,64
82	Лактоферрин, концентрация в плазме	11,8	23,7	8,85	9,93	14,51	15,42	12,12	13,80	5,90	6,62	9,68	10,28	8,08	9,20	2,95	3,31	4,84	5,14	4,04	4,60
83	Лейкоциты, подсчет в крови	10,9	19,6	8,18	8,41	13,41	13,48	11,20	11,99	5,45	5,61	8,94	8,99	7,47	7,99	2,73	2,80	4,47	4,49	3,73	4,00
84	Лимфоциты, подсчет в крови	10,4	27,8	7,80	11,13	12,79	15,97	10,69	14,55	5,20	7,42	8,53	10,64	7,12	9,70	2,60	3,71	4,26	5,32	3,56	4,85
85	Липаза в сыворотке	23,1	33,1	17,33	15,14	28,41	25,88	23,74	22,72	11,55	10,09	18,94	17,25	15,82	15,15	5,78	5,05	9,47	8,63	7,91	7,57
86	Липопротеин (а), концентрация в сыворотке	8,5	85,8	6,38	32,33	10,46	36,29	8,73	35,12	4,25	21,56	6,97	24,19	5,82	23,42	2,13	10,78	3,49	12,10	2,91	11,71
87	ЛПНП—рецептор к митохондриальной РНК	21,5	13,6	16,13	9,54	26,45	19,54	22,09	16,60	10,75	6,36	17,63	13,03	14,73	11,07	5,38	3,18	8,82	6,51	7,36	5,53
88	Лютеинизирующий гормон, концентрация в сыворотке	14,5	27,8	10,88	11,76	17,84	18,50	14,90	16,52	7,25	7,84	11,89	12,33	9,93	11,01	3,63	3,92	5,95	6,17	4,97	5,51
89	Магний, концентрация в сыворотке	3,6	6,4	2,70	2,75	4,43	4,43	3,70	3,94	1,80	1,84	2,95	2,95	2,47	2,62	0,90	0,92	1,48	1,48	1,23	1,31
	Магний, концентрация в лейкоцитах	18,3	16,4	13,73	9,22	22,51	17,72	18,80	15,23	9,15	6,14	15,01	11,82	12,54	10,15	4,58	3,07	7,50	5,91	6,27	5,08
	Магний, концентрация в эритроцитах	5,6	11,3	4,20	4,73	6,89	7,33	5,75	6,57	2,80	3,15	4,59	4,89	3,84	4,38	1,40	1,58	2,30	2,44	1,92	2,19
	Магний, количество в суточной моче	38,4	37,6	28,80	20,15	47,23	38,01	39,46	32,77	19,20	13,44	31,49	25,34	26,30	21,85	9,60	6,72	15,74	12,67	13,15	10,92
	Магний, количество в суточной порции мочи	38,3	37,6	28,73	20,13	47,11	37,94	39,35	32,71	19,15	13,42	31,41	25,29	26,24	21,81	9,58	6,71	15,70	12,65	13,12	10,90
	Магний, концентрация в случайной порции мочи	57,4	33,0	43,05	24,83	70,60	51,52	58,98	43,68	28,70	16,55	47,07	34,35	39,32	29,12	14,35	8,28	23,53	17,17	19,66	14,56

		Биол. Вар.		1 уровень, %						2 уровень – базовый, %						3 уровень, %					
		Cvi	CVg	Цел. Знач.		ПДЗ				Цел. Значение		ПДЗ				Цел. Значен.		ПДЗ			
				CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20
	Магний, концентрация в суточной моче	45,4	37,4	34,05	22,06	55,84	43,17	46,65	36,97	22,70	14,71	37,23	28,78	31,10	24,65	11,35	7,35	18,61	14,39	15,55	12,32
	Магний, концентрация в утренней моче	47,2	37,0	35,40	22,49	58,06	44,44	48,50	38,00	23,60	14,99	38,70	29,63	32,33	25,33	11,80	7,50	19,35	14,81	16,17	12,67
90	Магний/креатинин, отношение концентраций в суточной моче	35,0	24,0	26,25	15,91	43,05	32,19	35,96	27,41	17,50	10,61	28,70	21,46	23,98	18,27	8,75	5,30	14,35	10,73	11,99	9,14
	Магний/креатинин, отношение концентраций в утренней моче	35,0	34,0	26,25	18,30	43,05	34,57	35,96	29,80	17,50	12,20	28,70	23,05	23,98	19,86	8,75	6,10	14,35	11,52	11,99	9,93
91	Макроглобулин α—2, концентрация в сыворотке	3,1	18,7	2,33	7,11	3,81	8,55	3,19	8,13	1,55	4,74	2,54	5,70	2,12	5,42	0,78	2,37	1,27	2,85	1,06	2,71
92	Медь, концентрация в плазме	8,0	19,0	6,00	7,73	9,84	11,45	8,22		4,00		6,56		5,48		2,00	2,58	3,28	3,82	2,74	3,45
	Медь, концентрация в сыворотке	4,9	13,6	3,68	5,42	6,03	7,70	5,03	7,03	2,45	3,61	4,02	5,13	3,36	4,69	1,23	1,81	2,01	2,57	1,68	2,34
93	Микроглобулин α—1, концентрация в утренней моче	33,0	58,0	24,75	25,02	40,59	40,37	33,91	35,86	16,50	16,68	27,06	26,91	22,61	23,91	8,25	8,34	13,53	13,46	11,30	11,95

94	Микроглобулин β-2, концентрация в утренней моче	29,0	32,0	21,75	16,19	35,67	29,68	29,80	25,72	14,50	10,80	23,78	19,79	19,87	17,15	7,25	5,40	11,89	9,89	9,93	8,57
95	Микроглобулин-β-2, концентрация в сыворотке	5,9	15,5	4,43	6,22	7,26	8,96	6,06	8,16	2,95	4,15	4,84	5,98	4,04	5,44	1,48	2,07	2,42	2,99	2,02	2,72
96	Миоглобин в сыворотке	13,9	29,6	10,43	12,26	17,10	18,73	14,28		6,95		11,40		9,52		3,48	4,09	5,70	6,24	4,76	5,61
97	Моноциты, доли во фракции лейкоцитов	9,8	13,6	7,35	6,29	12,05	10,84	10,07	9,51	4,90	4,19	8,04	7,23	6,71	6,34	2,45	2,10	4,02	3,61	3,36	3,17
	Моноциты, подсчет в крови	17,8	49,8	13,35	19,83	21,89	28,11	18,29	25,68	8,90	13,22	14,60	18,74	12,19	17,12	4,45	6,61	7,30	9,37	6,10	8,56
98	Мочевая кислота, концентрация в сыворотке	12,3	18,3	9,23	8,27	15,13	13,99	12,64	12,31	6,15	5,51	10,09	9,33	8,43	8,21	3,08	2,76	5,04	4,66	4,21	4,10
	Мочевая кислота, количество в суточной моче	24,7	22,1	18,53	12,43	30,38	23,91	25,38	20,54	12,35	8,29	20,25	15,94	16,92	13,70	6,18	4,14	10,13	7,97	8,46	6,85
	Мочевая кислота, количество в сыворотке	8,6	17,2	6,45	7,21	10,58	11,21	8,84	10,04	4,30	4,81	7,05	7,47	5,89	6,69	2,15	2,40	3,53	3,74	2,95	3,35
	Мочевая кислота, концентрация в моче	22,7	25,9	17,03	12,91	27,92	23,47	23,32	20,37	11,35	8,61	18,61	15,65	15,55	13,58	5,68	4,30	9,31	7,82	7,77	6,79

		Биол. Вар.		1 уровень, %						2 уровень. – базовый, %						3 уровень, %					
		Cvi	CVg	Цел. Знач.		ПДЗ				Цел. Значение		ПДЗ				Цел. Значен.		ПДЗ			
				CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20
	Мочевая кислота, концентрация в суточной моче	25,1	17,4	18,83	11,45	30,87	23,12	25,79	19,70	12,55	7,64	20,58	15,42	17,19	13,13	6,28	3,82	10,29	7,71	8,60	6,57
99	Мочевина, концентрация в сыворотке	12,3	18,3	9,23	8,27	15,13	13,99	12,64	12,31	6,15	5,51	10,09	9,33	8,43	8,21	3,08	2,76	5,04	4,66	4,21	4,10
	Мочевина, количество в суточной моче	18,5	14,4	13,88	8,79	22,76	17,39	19,01	14,87	9,25	5,86	15,17	11,60	12,67	9,91	4,63	2,93	7,59	5,80	6,34	4,96
	Мочевина, концентрация в случайной порции мочи	25,3	28,1	18,98	14,18	31,12	25,94	26,00	22,49	12,65	9,45	20,75	17,30	17,33	14,99	6,33	4,73	10,37	8,65	8,67	7,50
	Мочевина, концентрация в суточной моче	23,2	25,9	17,40	13,04	28,54	23,83	23,84	20,66	11,60	8,69	19,02	15,88	15,89	13,77	5,80	4,35	9,51	7,94	7,95	6,89
100	Натрий, концентрация в сыворотке	0,7	1,0	0,53	0,46	0,86	0,78	0,72	0,69	0,35	0,31	0,57	0,52	0,48	0,46	0,18	0,15	0,29	0,26	0,24	0,23
	Натрий, концентрация в лейкоцитах	51,0	36,4	38,25	23,50	62,73	47,21	52,40	40,25	25,50	15,66	41,82	31,47	34,94	26,83	12,75	7,83	20,91	15,74	17,47	13,42
	Натрий, концентрация в эритроцитах	1,8	12,4	1,35	4,70	2,21	5,54	1,85	5,29	0,90	3,13	1,48	3,69	1,23	3,53	0,45	1,57	0,74	1,85	0,62	1,76

	Натрий, количество в суточной моче	28,7	18,6	21,53	12,83	35,30	26,17	29,49	22,25	14,35	8,55	23,53	17,45	19,66	14,84	7,18	4,28	11,77	8,72	9,83	7,42
	Натрий, концентрация в суточной моче	24,0	26,8	18,00	13,49	29,52	24,65	24,66	21,37	12,00	8,99	19,68	16,43	16,44	14,25	6,00	4,50	9,84	8,22	8,22	7,12
101	Нейтрофилы, подсчет в крови	16,1	32,8	12,08	13,70	19,80	21,19	16,54	18,99	8,05	9,13	13,20	14,13	11,03	12,66	4,03	4,57	6,60	7,06	5,51	6,33
102	Нуклеотидаза—5, активность в сыворотке	23,2	19,9	17,40	11,46	28,54	22,25	23,84	19,08	11,60	7,64	19,02	14,83	15,89	12,72	5,80	3,82	9,51	7,42	7,95	6,36
103	Оксалат, количество в суточной моче	42,5	19,9	31,88	17,60	52,28	37,36	43,67	31,56	21,25	11,73	34,85	24,91	29,11	21,04	10,63	5,87	17,43	12,45	14,56	10,52
	Оксалат, концентрация в суточной моче	44,0	18,0	33,00	17,83	54,12	38,29	45,21	32,28	22,00	11,88	36,08	25,52	30,14	21,52	11,00	5,94	18,04	12,76	15,07	10,76
104	Оксииндолилуксусная 5 кислота, концентрация в суточной моче	20,3	33,2	15,23	14,59	24,97	24,03	20,86	21,26	10,15	9,73	16,65	16,02	13,91	14,17	5,08	4,86	8,32	8,01	6,95	7,09
105	Оксипролин, экскреция в минуту в ночной моче	36,1	38,8	27,08	19,87	44,40	36,66	37,09	31,73	18,05	13,25	29,60	24,44	24,73	21,16	9,03	6,62	14,80	12,22	12,36	10,58
106	Осмолярность сыворотки	1,3	1,2	0,98	0,66	1,60	1,27	1,34	1,09	0,65	0,44	1,07	0,85	0,89	0,73	0,33	0,22	0,53	0,42	0,45	0,36
107	Остеокальцин, концентрация в сыворотке	6,3	23,1	4,73	8,98	7,75	11,91	6,47	11,05	3,15	5,99	5,17	7,94	4,32	7,37	1,58	2,99	2,58	3,97	2,16	3,68
108	Парциальное давление CO2	4,8	5,3	3,60	2,68	5,90	4,91	4,93	4,26	2,40	1,79	3,94	3,28	3,29	2,84	1,20	0,89	1,97	1,64	1,64	1,42

		Биол. Вар.		1 уровень, %						2 уровень – базовый, %						3 уровень, %					
		Cvi	CVg	Цел. Знач.		ПДЗ				Цел. Значение		ПДЗ				Цел. Значен.		ПДЗ			
				CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20
109	Пируват, концентрация в сыворотке	15,2	13,0	11,40	7,50	18,70	14,57	15,62	12,49	7,60	5,00	12,46	9,71	10,41	8,33	3,80	2,50	6,23	4,86	5,21	4,16
110	Преальбумин, концентрация в сыворотке	10,9	19,1	8,18	8,25	13,41	13,32	11,20	11,83	5,45	5,50	8,94	8,88	7,47	7,88	2,73	2,75	4,47	4,44	3,73	3,94
111	Пролактин, концентрация в сыворотке (мужчины)	6,9	61,2	5,18	23,10	8,49	26,30	7,09	25,36	3,45	15,40	5,66	17,54	4,73	16,91	1,73	7,70	2,83	8,77	2,36	8,45
112	Протеиназодопептидаза, активность в плазме	16,8	13,9	12,60	8,18	20,66	15,99	17,26	13,70	8,40	5,45	13,78	10,66	11,51	9,13	4,20	2,73	6,89	5,33	5,75	4,57
113	Простатический специфический антиген	14,0	72,4	10,50	27,65	17,22	34,16	14,39	32,25	7,00	18,44	11,48	22,78	9,59	21,50	3,50	9,22	5,74	11,39	4,80	10,75
114	Протеин S	5,8	63,4	4,35	23,87	7,13	26,57	5,96	25,78	2,90	15,92	4,76	17,71	3,97	17,19	1,45	7,96	2,38	8,86	1,99	8,59
115	Протеин С	5,8	55,2	4,35	20,81	7,13	23,51	5,96	22,72	2,90	13,88	4,76	15,67	3,97	15,15	1,45	6,94	2,38	7,84	1,99	7,57
116	Протромбиновое время	4,0	6,8	3,00	2,96	4,92	4,82	4,11	4,27	2,00	1,97	3,28	3,21	2,74	2,85	1,00	0,99	1,64	1,61	1,37	1,42
117	Раковоэмбриональный антиген, концентрация в сыворотке	9,3	55,6	6,98	21,14	11,44	25,46	9,56	24,19	4,65	14,09	7,63	16,98	6,37	16,13	2,33	7,05	3,81	8,49	3,19	8,06
118	Ревматоидный фактор, концентрация в сыворотке	8,5	24,5	6,38	9,72	10,46	13,68	8,73	12,52	4,25	6,48	6,97	9,12	5,82	8,34	2,13	3,24	3,49	4,56	2,91	4,17

119	Ретинол, концентрация в сыворотке	14,8	18,3	11,10	8,83	18,20	15,71	15,21	13,69	7,40	5,88	12,14	10,47	10,14	9,13	3,70	2,94	6,07	5,24	5,07	4,56
120	pH плазмы крови	3,5	2,0	2,63	1,51	4,31	3,14	3,60	2,66	1,75	1,01	2,87	2,09	2,40	1,77	0,88	0,50	1,44	1,05	1,20	0,89
121	Свертывания фактор VII	6,8	19,4	5,10	7,71	8,36	10,87	6,99	9,94	3,40	5,14	5,58	7,25	4,66	6,63	1,70	2,57	2,79	3,62	2,33	3,31
122	Свертывания фактор VIII	4,8	19,1	3,60	7,39	5,90	9,62	4,93	8,96	2,40	4,92	3,94	6,41	3,29	5,97	1,20	2,46	1,97	3,21	1,64	2,99
123	Селен, концентрация в крови	12,0	12,0	9,00	6,36	14,76	11,94	12,33	10,31	6,00	4,24	9,84	7,96	8,22	6,87	3,00	2,12	4,92	3,98	4,11	3,44
	Селен, концентрация в плазме	12,0	14,0	9,00	6,91	14,76	12,49	12,33	10,86	6,00	4,61	9,84	8,33	8,22	7,24	3,00	2,30	4,92	4,16	4,11	3,62
124	С—пептид, концентрация в сыворотке	9,3	13,3	6,98	6,09	11,44	10,41	9,56	9,14	4,65	4,06	7,63	6,94	6,37	6,09	2,33	2,03	3,81	3,47	3,19	3,05
125	С—пропептид тип 1, проколлаген в сыворотке	8,2	17,6	6,15	7,28	10,09	3,81	8,43	2,69	4,10	4,85	6,72	7,40	5,62	6,65	2,05	2,43	3,36	3,70	2,81	3,32
126	С—реактивный белок, концентрация в сыворотке	52,6	84,4	39,45	37,29	64,70	61,75	54,05	54,57	26,30	24,86	43,13	41,17	36,03	36,38	13,15	12,43	21,57	20,58	18,02	18,19
127	С—телопептид тип 1 проколлаген, концентрация в сыворотке	8,0	28,8	6,00	11,21	9,84	14,93	8,22	13,84	4,00	7,47	6,56	9,95	5,48	9,22	2,00	3,74	3,28	4,98	2,74	4,61
128	Супероксиддисмутаза, активность в сыворотке	17,1	10,5	12,83	7,52	21,03	15,48	17,57	13,14	8,55	5,02	14,02	10,32	11,71	8,76	4,28	2,51	7,01	5,16	5,86	4,38
129	Т3—захват	4,5	4,5	3,38	2,39	5,54	4,48	4,62	3,86	2,25	1,59	3,69	2,99	3,08	2,58	1,13	0,80	1,85	1,49	1,54	1,29

		Биол. Вар.		1 уровень, %						2 уровень – базовый, %						3 уровень, %					
		Cvi	CVg	Цел. Знач.		ПДЗ				Цел. Значение		ПДЗ				Цел. Значен.		ПДЗ			
				CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20
130	Тестостерон, концентрация в сыворотке	8,8	21,3	6,60	8,64	10,82	12,73	9,04	11,53	4,40	5,76	7,22	8,49	6,03	7,69	2,20	2,88	3,61	4,24	3,01	3,84
	Тестостерон, концентрация в слюне	17,3	28,8	12,98	12,60	21,28	20,64	17,78	18,28	8,65	8,40	14,19	13,76	11,85	12,19	4,33	4,20	7,09	6,88	5,93	6,09
131	Тироглобулин, концентрация в сыворотке	13,0	25,0	9,75	10,57	15,99	16,61	13,36	14,84	6,50	7,04	10,66	11,07	8,91	9,89	3,25	3,52	5,33	5,54	4,45	4,95
132	Тироксин свободный, концентрация в сыворотке	7,6	12,2	5,70	5,39	9,35	8,92	7,81	7,89	3,80	3,59	6,23	5,95	5,21	5,26	1,90	1,80	3,12	2,97	2,60	2,63
	Тироксин, концентрация в сыворотке	6,0	12,1	4,50	5,06	7,38	7,85	6,17	7,04	3,00	3,38	4,92	5,24	4,11	4,69	1,50	1,69	2,46	2,62	2,06	2,35
133	Тиротропин, концентрация в сыворотке	19,7	27,2	14,78	12,59	24,23	21,75	20,24	19,07	9,85	8,40	16,15	14,50	13,49	12,71	4,93	4,20	8,08	7,25	6,75	6,36
134	Тканевой полипептид специфический антиген, концентрация в сыворотке	28,3	133,0	21,23	50,99	34,81	64,15	29,08	60,29	14,15	33,99	23,21	42,77	19,39	40,19	7,08	17,00	11,60	21,38	9,69	20,10
135	Тканевой полипептидный антиген, концентрация в сыворотке	28,7	40,4	21,53	18,58	35,30	31,93	29,49	28,01	14,35	12,39	23,53	21,29	19,66	18,67	7,18	6,19	11,77	10,64	9,83	9,34

136	α-Токоферол, концентрация в сыворотке	13,8	13,3	10,35	7,19	16,97	13,60	14,18	11,72	6,90	4,79	11,32	9,07	9,45	7,81	3,45	2,40	5,66	4,53	4,73	3,91
137	Трансферрин, концентрация в сыворотке	3,0	4,3	2,25	1,97	3,69	3,36	3,08	2,95	1,50	1,31	2,46	2,24	2,06	1,97	0,75	0,66	1,23	1,12	1,03	0,98
138	Трансферрин десиализированный, концентрация в сыворотке	7,1	38,7	5,33	14,75	8,73	18,06	7,30	17,09	3,55	9,84	5,82	12,04	4,86	11,39	1,78	4,92	2,91	6,02	2,43	5,70
139	Триглицеридлипаза, активность в сыворотке	32,2	36,0	24,15	18,11	39,61	33,09	33,09	28,69	16,10	12,07	26,40	22,06	22,06	19,13	8,05	6,04	13,20	11,03	11,03	9,56
140	Триглицериды, концентрация в сыворотке	21,0	37,2	15,75	16,02	25,83	25,78	21,58	22,92	10,50	10,68	17,22	17,19	14,39	15,28	5,25	5,34	8,61	8,59	7,19	7,64
141	Трийодтиронин свободный, концентрация в сыворотке	8,7	14,4	6,53	6,31	10,70	10,35	8,94	9,17	4,35	4,21	7,13	6,90	5,96	6,11	2,18	2,10	3,57	3,45	2,98	3,06
142	Тромбоциты, подсчет в крови	9,1	21,9	6,83	8,89	11,19	13,12	9,35	11,88	4,55	5,93	7,46	8,75	6,23	7,92	2,28	2,96	3,73	4,37	3,12	3,96
143	Тромбоциты, средний объем клетки	4,3	8,1	3,23	3,44	5,29	5,44	4,42	4,85	2,15	2,29	3,53	3,63	2,95	3,23	1,08	1,15	1,76	1,81	1,47	1,62
144	Фактор Виллебранда в сыворотке	0,0	23,8	0,00	8,93	0,00	8,93	0,00	8,93	0,00	5,95	0,00	5,95	0,00	5,95	0,00	2,98	0,00	2,98	0,00	2,98
145	Фактор деградации гемоглобина Г6	32,8	31,8	24,60	17,13	40,34	32,38	33,70	27,91	16,40	11,42	26,90	21,59	22,47	18,60	8,20	5,71	13,45	10,79	11,23	9,30

		Биол. Вар.		1 уровень, %						2 уровень – базовый, %						3 уровень, %					
		Cvi	CVg	Цел. Знач.		ПДЗ				Цел. Значение		ПДЗ				Цел. Значен.		ПДЗ			
				CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20
146	Ферритин, концентрация в сыворотке	14,9	13,5	11,18	7,54	18,33	14,47	15,31	12,43	7,45	5,03	12,22	9,65	10,21	8,29	3,73	2,51	6,11	4,82	5,10	4,14
147	Фибриноген, концентрация в плазме	10,7	15,8	8,03	7,16	13,16	12,13	10,99	10,67	5,35	4,77	8,77	8,09	7,33	7,11	2,68	2,39	4,39	4,04	3,66	3,56
148	Фолитропин, концентрация в сыворотке	10,1	32,0	7,58	12,58	12,42	17,28	10,38	15,90	5,05	8,39	8,28	11,52	6,92	10,60	2,53	4,19	4,14	5,76	3,46	5,30
149	Фосфата неорганического канальцевая реабсорбция	2,7	3,3	2,03	1,60	3,32	2,85	2,77	2,49	1,35	1,07	2,21	1,90	1,85	1,66	0,68	0,53	1,11	0,95	0,92	0,83
150	Фосфолипиды, концентрация в сыворотке	6,5	11,1	4,88	4,82	8,00	7,85	6,68	6,96	3,25	3,22	5,33	5,23	4,45	4,64	1,63	1,61	2,67	2,62	2,23	2,32
151	Фосфор неорганический, концентрация в сыворотке	8,5	9,4	6,38	4,75	10,46	8,70	8,73	7,54	4,25	3,17	6,97	5,80	5,82	5,03	2,13	1,58	3,49	2,90	2,91	2,51
	Фосфор неорганический, к-во в суточной моче	18,0	22,6	13,50	10,83	22,14	19,20	18,50	16,75	9,00	7,22	14,76	12,80	12,33	11,17	4,50	3,61	7,38	6,40	6,17	5,58
	Фосфор неорганический, концентрация в суточной моче	26,4	26,5	19,80	14,03	32,47	26,30	27,13	22,70	13,20	9,35	21,65	17,54	18,08	15,13	6,60	4,68	10,82	8,77	9,04	7,57

152	Фруктозамин, концентрация в сыворотке	3,4	5,9	2,55	2,55	4,18	4,13	3,49	3,67	1,70	1,70	2,79	2,76	2,33	2,45	0,85	0,85	1,39	1,38	1,16	1,22
153	Хлориды, к-ция в сыворотке	1,2	1,5	0,90	0,72	1,48	1,28	1,23	1,11	0,60	0,48	0,98	0,85	0,82	0,74	0,30	0,24	0,49	0,43	0,41	0,37
154	Холестерин, концентрация в сыворотке	6,0	15,2	4,50	6,13	7,38	8,92	6,17	8,10	3,00	4,09	4,92	5,95	4,11	5,40	1,50	2,04	2,46	2,97	2,06	2,70
155	Холестерин ЛПВП, к-ция в сыворотке	7,1	19,7	5,33	7,85	8,73	11,15	7,30	10,18	3,55	5,24	5,82	7,44	4,86	6,79	1,78	2,62	2,91	3,72	2,43	3,39
156	Холестерин ЛПВП 1, к-ция в сыворотке	15,5	27,2	11,63	11,74	19,07	18,95	15,93	16,83	7,75	7,83	12,71	12,63	10,62	11,22	3,88	3,91	6,36	6,32	5,31	5,61
157	Холестерин ЛПВП—2, концентрация в сыворотке	15,7	40,7	11,78	16,36	19,31	23,66	16,13	21,52	7,85	10,91	12,87	15,77	10,75	14,34	3,93	5,45	6,44	7,89	5,38	7,17
158	Холестерин ЛПВП—3, к-ция в сыворотке	7,0	14,3	5,25	5,97	8,61	9,23	7,19	8,27	3,50	3,98	5,74	6,15	4,80	5,51	1,75	1,99	2,87	3,08	2,40	2,76
159	Холестерин ЛПНП, к-ция в сыворотке	8,3	25,7	6,23	10,13	10,21	13,99	8,53	12,85	4,15	6,75	6,81	9,32	5,69	8,57	2,08	3,38	3,40	4,66	2,84	4,28
160	Холестерин ЛПНП/ холестерин общий, отношение к-ций в сыворотке	9,7	10,9	7,28	5,47	11,93	9,98	9,97	8,66	4,85	3,65	7,95	6,65	6,64	5,77	2,43	1,82	3,98	3,33	3,32	2,89
161	Холинэстераза, активность в сыворотке	5,4	10,3	4,05	4,36	6,64	6,87	5,55	6,14	2,70	2,91	4,43	4,58	3,70	4,09	1,35	1,45	2,21	2,29	1,85	2,05

		Биол. Вар.		1 уровень, %						2 уровень – базовый, %						3 уровень, %					
		Cvi	CVg	Цел. Знач.		ПДЗ				Цел. Значение		ПДЗ				Цел. Значен.		ПДЗ			
				CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20	CV	B	CV10	B10	CV20	B20
162	Церулоплазмин	5,7	11,1	4,28	4,68	7,01	7,33	5,86	6,55	2,85	3,12	4,67	4,89	3,90	4,37	1,43	1,56	2,34	2,44	1,95	2,18
163	Цинк, к-ция в сыворотке	9,3	9,4	6,98	4,96	11,44	9,28	9,56	8,01	4,65	3,31	7,63	6,19	6,37	5,34	2,33	1,65	3,81	3,09	3,19	2,67
	Цинк, к-ция в плазме	11,0	14,0	8,25	6,68	13,53	11,79	11,30	10,29	5,50	4,45	9,02	7,86	7,54	6,86	2,75	2,23	4,51	3,93	3,77	3,43
164	Цистеин, к-ция в сыворотке	5,9	12,3	4,43	5,12	7,26	7,86	6,06	7,05	2,95	3,41	4,84	5,24	4,04	4,70	1,48	1,71	2,42	2,62	2,02	2,35
165	Щелочная фосфатаза , активность в сыворотке	6,4	24,8	4,80	9,60	7,87	12,58	6,58	11,71	3,20	6,40	5,25	8,39	4,38	7,80	1,60	3,20	2,62	4,19	2,19	3,90
	Щелочная фосфатаза костная, активность в сыворотке	6,6	35,6	4,95	13,58	8,12	16,65	6,78	15,75	3,30	9,05	5,41	11,10	4,52	10,50	1,65	4,53	2,71	5,55	2,26	5,25
166	Эластаза PJ	13,6	16,4	10,20	7,99	16,73	14,31	13,97	12,46	6,80	5,33	11,15	9,54	9,32	8,30	3,40	2,66	5,58	4,77	4,66	4,15
167	Эозинофилы, к-во в крови	21,0	76,4	15,75	29,71	25,83	39,48	21,58	36,61	10,50	19,81	17,22	26,32	14,39	24,41	5,25	9,90	8,61	13,16	7,19	12,20
168	Эритроциты, подсчет в крови	3,2	6,1	2,40	2,58	3,94	4,07	3,29	3,63	1,60	1,72	2,62	2,71	2,19	2,42	0,80	0,86	1,31	1,36	1,10	1,21
169	Эритроциты, средний объем клетки	1,3	4,8	0,98	1,86	1,60	2,47	1,34	2,29	0,65	1,24	1,07	1,65	0,89	1,53	0,33	0,62	0,53	0,82	0,45	0,76
170	Эстрадиол, концентрация в сыворотке	22,6	24,4	16,95	12,47	27,80	22,98	23,22	19,90	11,30	8,31	18,53	15,32	15,48	13,26	5,65	4,16	9,27	7,66	7,74	6,63

Таблица 27

Методы внутрилабораторного контроля качества исследований

Методы с использованием контрольного материала	*Методы с использованием данных пациентов*
Метод контрольных карт	Метод "средней нормы"
	Метод параллельных проб
Метод "cusum"	Метод дельта-контроля
Метод контрольных правил Westgard	Метод добавки
	Метод смешивания проб
	Сравнение методов

роль правдоподобности), в сопоставлении с пределами совместимости с жизнью (физиологический контроль), в сопоставлении с ожидаемым уровнем значений при данном виде патологии (клинические корреляции), в сопоставлении с результатами других тестов, отражающих те же или близкие функции организма (корреляция тестов), в сопоставлении различий результатов исследований у одного и того же пациента (дельта-контроль). Большая часть этих методов реально может проводиться при довольно ограниченных массивах данных. Для физиологического контроля и для дельта -контроля были разработаны количественные пределы с целью использования для их проведения компьютеров (Whiterhurst et al., 1975; Ladenson, 1975). Эти методы при их применении на больших массивах данных проявили недостаточно высокую способность обнаружения истинных ошибок анализа. Сложилось мнение, что подобные способы существенно уступают принятым в настоящее время методам контроля с применением контрольных материалов, однако могут использоваться как дополнительные.

Вторая группа способов внутрилабораторного контроля отличается от первой тем, что результаты исследований проб пациентов подвергаются специальным приемам статистической обработки и оценки. Среди способов этой группы контроль по средним арифметическим результатов исследований у групп пациентов, статистический анализ результатов исследований биоматериалов пациентов с использованием критерия Пирсона и контроль по дубликатам исследований. Способы контроля по средним и по дубликатам исследований предусмотрены как дополнительные "Правилами внутрилабораторного контроля качества количественных лабораторных исследований", утвержденными приказом Минздра-

ва РФ от 7.02.2000 г. № 45, и подробно описаны в этом документе (см. в данном томе). Отмечено, что способ контроля по ежедневным средним проб пациентов позволяет выявить систематические погрешности, допущенные не только на аналитическом этапе, но и на преаналитическом. Основы статистического анализа с применением критерия Пирсона - см. в разделе "Статистические методы в клинической лабораторной аналитике". Практика показывает, что этот способ в ряде случаев ретроспективно выявляет отклонения в точности исследований, не зафиксированные контролем с применением контрольных материалов. Следовательно, он также может рассматриваться как дополнительный способ контроля.

Третью группу способов внутрилабораторного контроля качества составляют способы с применением контрольных материалов. Действующими в нашей стране "Правилами внутрилабораторного контроля качества количественных лабораторных исследований" эти способы рассматриваются как основные. Контроль качества с использованием контрольных материалов носит статистический характер, (при этом распределение в ряду результатов исследования контрольных проб рассматривается как нормальное) и требует расчета по результатам исследований контрольных проб в определенном числе аналитических серий среднего арифметического значения, среднего квадратического отклонения, коэффициента вариации, относительного аналитического смещения; оценки допустимости характеризуемых коэффициентом вариации и смещением аналитических погрешностей путем сравнения их с установленными нормами точности; построения на основе этих данных контрольных карт; ежесерийного выполнения исследований контрольных материалов по всем выполняемым видам исследований и оценки степени соблюдения первоначально установленной точности с помощью контрольных правил.

Внешняя оценка качества состоит в оценке внешней организацией уровня точности исследований в лабораториях региона, страны, группы стран. Эта оценка может осуществляться с проведением инспекции на местах специальными контролерами или, что чаще, путем рассылки контрольных материалов из единого пула группе лабораторий с последующим сравнением данных, полученных каждой лабораторией, со средними значениями для всей группы или со значением, установленным производителем контрольного материала.

Правила внутрилабораторного контроля качества количественных клинических лабораторных исследований

При разработке раздела отечественной концепции управления качеством клинических лабораторных исследований, определяющего порядок контроля качества, учитывались современные взгляды относительно:

- наиболее информативных способов оценки различных видов погрешностей аналитической процедуры и их влияния на конечный результат клинического лабораторного анализа;
- наиболее совершенных и в то же время наиболее доступных материальных средств, используемых для контрольных исследований;

наиболее адекватных методов математической статистики для обработки результатов контрольных исследований;

- наиболее основательных ориентиров для суждения о качестве исследований. В повседневной работе лаборатории должно осуществляться постоянное слежение за необходимой точностью результатов путем контроля за возникновением как случайных, так и систематических погрешностей с помощью контрольных карт и контрольных правил. Целью обнаружения случайной ошибки является выявление тенденции сдвигов результатов исследований. Обнаружение систематической ошибки (смещения) требует слежения за результатами методов исследования во всем диапазоне измерений и связано с обнаружением матричных эффектов. Выявление систематической ошибки предупреждает возможность неправильной интерпретации данных.

Контрольные материалы

Поскольку оценить точность клинического лабораторного исследования прямым способом нельзя, в клинической лабораторной практике утвердилась иная система оценки качества исследований, основанная на включении в серию проб биоматериалов пациентов проб контрольных материалов. Контрольным материалом является однородный материал, по возможности близкий по своему составу и свойствам исследуемому биологическому материалу пациентов. Такие образцы биологических материалов имеют ряд преимуществ перед другими способами контроля. Как правило, их можно изготовить в относительно больших количествах, что позволяет применять их сразу во многих лабораториях, обеспечивая в течение длительного времени единство измерения. Предпочтительнее использовать контрольный материал с матрицей (основным составом белков и других компонентов), идентичной исследуемому биоматериалу пациентов, что

уменьшает погрешности, обусловленные несоответствием образцов и анализируемых проб, однако, за исключением контроля отдельных аналитов, можно применять и контрольные материалы животного происхождения, которые относительно дешевы. Практически контрольный материал является специфической формой стандартного образца, только он применяется не для калибровки, а для контроля точности производимых исследований проб пациентов. Статистическая обработка результатов исследований проб контрольных материалов используется для оценки погрешности исследования проб пациентов, поскольку контрольные пробы исследуются в тех же условиях, что и пробы пациентов.

Контрольные материалы при их промышленном изготовлении могут подвергаться исследованию для определения содержания в них различных компонентов. Сведения об установленных (аттестованных) значениях отдельных компонентов и допустимые пределы измерения приводятся в паспорте контрольного материала. Такие контрольные материалы могут применяться для контроля правильности и воспроизводимости лабораторных исследований. Контрольные материалы с неисследованным содержанием компонентов, в том числе и приготовленные в самой лаборатории из слива неиспользованных остатков образцов биоматериалов пациентов, применяются для контроля воспроизводимости.

Приготовление слитой сыворотки. Клиническая лаборатория каждый день собирает остатки сыворотки от проб больных с целью контроля качества. Количество нормальной и патологической контрольной сыворотки, необходимое на день работы (от 10 до 30 мл каждой), находится в зависимости от объема работы лаборатории.

Этапы приготовления сыворотки: остающуюся от ежедневных проб сыворотку от больных сливают и хранят в пластиковых бутылях при -20°С. Последующие порции сыворотки сливают на замороженную смесь прямо в бутыль. Гемолизированную, желтушную, липемическую и загрязненную сыворотку, а также сыворотку больных с подозрением на гепатит и СПИД отбрасывают. За 2 недели перед розливом сыворотку оттаивают при комнатной температуре, тщательно перемешивают стеклянной палочкой или при помощи магнитной мешалки. Слив центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10—20 мин в нескольких удобных бутылях для оседания фибрина, который может присутствовать (не подвергать действию света). Сыворотку фильтруют и разливают в соответствии с ежедневной потребностью (по 3,5, 10, 15 мл) в пузырьки и плотно укупоривают. Хранят пузырьки в вертикальном положении при -20°С. Этот слив можно использовать как

нормальную контрольную сыворотку для биохимических исследований. Слитая сыворотка представляет собой простейший вид контрольного материала, используемый в контроле воспроизводимости клинико-химических исследований. Однако потребности лабораторий далеко превосходят контрольные возможности слитой сыворотки.

Поэтому получило широкое развитие *промышленное производство контрольных материалов* различного назначения и различного способа приготовления.

Основные требования к контрольным материалам состоят в обеспечении стабильности при хранении; минимальной межфлаконной вариации; гомогенности; простоте использования. Сущность этих требований определяется необходимостью иметь достаточно постоянный (во времени, в различных сериях исследований) ориентир для сравнения с результатами исследований проб пациентов.

Контрольные материалы могут быть приготовлены:

– на основе человеческого биоматериала;

– на основе биоматериала, взятого у животных (лошадь, бык, свинья);

– на основе искусственного материала;

– значения содержания аналитов приведены на основе проведенных исследований материала, взятого у человека или животных;

– к исходному биоматериалу добавлены вещества человеческого, животного происхождения или синтезированные искусственным путем.

Свойства контрольного материала зависят от матрицы (исходного материала) и способа приготовления (табл. 28).

Контрольные материалы могут выпускаться в нативной форме (например, жидкие сыворотки) или в лиофилизированном (т. е. высушенные при охлаждении в вакууме) виде.

Жидкие материалы удобнее для использования : нет необходимости предварительного растворения, что требует времени и может быть источником ошибки; они сохраняют прозрачность, гомогенны. К сожалению, не все компоненты биоматериала сохраняют стабильность при хранении, даже при добавленном стабилизаторе. Сухие лиофилизированные материалы имеют более длительную стабильность большинства компонентов, однако, требуют тщательного растворения в течение 20—30 мин, точности при дозировании объема растворителя; раствор контрольного материала более мутный, чем нативная сыворотка, что вызвано денатурацией белков в процессе лиофилизации. Приготовление лиофилизированных контрольных материалов, не дающих мутности, связано с

Таблица 28

Преимущества и недостатки сывороток с разными матрицами (Libeer J.C., 1995)

Матрица	*Преимущества*	*Недостатки*
Человеческая сыворотка	Ведет себя аналогично пробам пациентов	Трудности при получении патологических величин. Риск инфицирования
Человеческая сыворотка (добавлены человеческие или синт. вещества)	- « -	Иногда имеются отклонения в поведении для синтетических веществ в сравнении с пробами пациентов. Риск инфицирования
Человеческая сыворотка (добавлены вещества животного происхождения)	Человеческая матрица с нормальными и патологическими концентрациями	Не используется для иммунохимических методов. Имеются отклонения в сравнении с пробами пациентов. Риск инфицирования.
Сыворотка животных	Легкость получения. Нет риска инфицирования. Легкость ручного приготовления	Не используется для альбумина (методы связывания), некоторых иммуноисследований, изоферментов, пептидных гормонов, железа, холестерина липопротеидов высокой плотности
Искусственный материал	Легкость получения. Нет риска инфицирования. Легкость ручного приготовления	Ограниченное применение

усложнением процессов их производства (например, диализ, удаление липопротеидов), что в свою очередь может нежелательно влиять на другие качества контрольного материала (соответствие матриц).

В настоящее время доступен обширный ассортимент коммерческих контрольных материалов. Они могут быть с неизмеренным и измерен-

ным референтными методами содержанием аналитов; предназначены для контроля исследований различных биоматериалов (цельная кровь, сыворотка, плазма, моча, спинномозговая жидкость), различных видов исследований (клинико-химические тесты, исследования активности ферментов, определение электролитов, иммунных тел, лекарств), отдельных групп веществ (липиды, билирубин, гемоглобины, газы крови, маркеры опухолей, маркеры инфаркта миокарда, алкоголь и аммиак), содержать контролируемые аналиты в нормальной или патологической концентрации. Наличие такого разнообразия контрольных материалов позволяет лабораториям осуществлять постоянное слежение за качеством выполнения практически всех широко используемых лабораторных тестов.

Так, один из крупнейших производителей контрольных материалов для оценки правильности и воспроизводимости фирма Bio-Rad (США) производит более 50 типов лиофилизированных и жидких контрольных материалов на основе биожидкостей человека (цельная кровь сыворотка, моча, спинномозговая жидкость), содержащих около 350 аналитов. Контроли этой фирмы многокомпонентны. Так, контроли для исследований мочи, сыворотки, гормонов содержат каждый более 55 компонентов. Некоторые из контролей ориентированы на профиль исследований в рядовых лабораториях больничной сети, другие предназначены для специальных целей (исследования опухолевых маркеров - 21 компонент; контроль иммунологии и исследований белков - 23 компонента; педиатрические исследования - 13 компонентов; ревматологический контроль - 16 компонентов).

Контрольные материалы выпускаются во флаконах различного объема, протестированы многими методами и на различных приборах, что определяет возможность их применения в лабораториях, значительно различающихся по условиям выполнения в них анализов. Выпускаются контрольные материалы с концентрациями двух и даже трех уровней (норма и патология). Гарантирована сохранность контролей в закрытых флаконах до 2 - 3 лет. Коэффициент межфлаконной вариации 0,5%.

Разнообразные по ассортименту и свойствам контрольные материалы предлагают многие зарубежные и отечественные фирмы.

Контрольные карты

Shewhart (1931), впервые выдвинувший идею контроля качества с помощью статистических методов, исходил из того, что явление может рассматриваться как находящееся под контролем, если на основании прошлого опыта можно предсказать, по крайней мере в некоторых пределах, как это явление может изменяться в будущем. В качестве способа использова-

ния ретроспективного статистического анализа для оценки будущих событий Shewhart предложил карту контроля процесса, которую Levey и Jennings (1950) применили в контроле качества результатов клинико-химических исследований. Последующие уточнения Henry, Segalove (1952) привели к установлению того вида контрольных карт и правил их составления и ведения, которые приняты в настоящее время всеми лабораториями, как способ повседневного контроля лабораторных результатов.

Постоянное проведение внутрилабораторного контроля качества является, согласно положению о КДЛ (Приказ Минздрава РФ №380 от 25 декабря 1997 г.), обязательным для всех лабораторий и служит непременным условием при их аккредитации. Основным документом, регламентирующим практическое осуществление контроля качества количественных исследований во всех без исключения лабораториях, являются вновь разработанные *"Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных лабораторных исследований"* (см в данном томе), утвержденные приказом Минздрава РФ № 45 от 7.02.2000 г. В них детально описаны процедуры проведения контроля качества с использованием контрольных материалов и без них, порядок построения контрольных диаграмм, их систематического ведения и применения контрольных правил для оценки допустимости результатов исследований.

Установленный "Правилами" порядок проведения внутрилабораторного контроля качества с применением контрольных материалов предусматривает 3 стадии этого процесса.

1 стадия. Цель: проверка соответствия внутрисерийной воспроизводимости установленным нормам точности.

Способ: 10 измерений в одном материале (контрольный материал или проба пациента) в рамках одной аналитической серии.

Критерий: $CV_{BC} < 0,5 \cdot CV_{10}$, т.е. коэффициент внутрисерийной вариации должен быть не больше половины предельно допустимого значения коэффициента общей аналитической вариации, установленного "Временными нормами точности клинических лабораторных исследований" (приложение 3 к приказу Минздрава России от 7.02.2000 г.).

Меры: при несоответствии коэффициента внутрисерийной вариации ПДЗ CV_{10} должны быть приняты меры по улучшению выполнения анализа или осуществлена замена методики более точной, после чего вновь проведены 10 измерений одного и того же материала в рамках одной аналитической серии.

2 стадия. Цели: оценка соответствия величин относительного аналитического смещения и общей аналитической вариации установленным нормам точности;

построение контрольной карты для каждого аналита (для одного или двух контрольных материалов).

Способ: провести по 1 измерению каждого контрольного материала (неаттестованного для текущего контроля и аттестованного) в первых 10 аналитических сериях; осуществить расчет *относительного аналитического смещения* (B%) по результатам исследований проб *аттестованного* материала *и общей аналитической вариации* (CV%) по результатам исследований *неаттестованного* материала.

Критерии: B_{10} и CV_{10} не должны превышать соответствующих предельно допустимых значений.

Меры: при превышении норм точности - осуществить устранение источников ошибок или сменить методику на более точную и повторить все процедуры этой стадии.

Способ: выполнить по 1 измерению контрольных проб в 20 аналитических сериях. Для каждого аналита целесообразно использовать два контрольных материала с разной концентрацией искомого аналита, однако возможно применение и одного материала, желательно с концентрацией аналита ближе к нижнему пределу диапазона измерений.

Критерии: значения B_{20} и CV_{20} не должны превышать соответствующих ПДЗ.

Меры: при превышении ПДЗ должны быть устранены источники ошибок или заменена методика, после чего вновь выполнена вся процедура.

Способ: из 20 результатов определения каждого аналита в каждом контрольном материале, предназначенном для текущего контроля, рассчитывают среднее арифметическое значение $\bar{X}$, среднее квадратическое отклонение S и контрльные пределы $\bar{X}+1S$, $\bar{X}-1S$, $\bar{X}+2S$, $\bar{X}-2S$, $\bar{X}+3S$, $\bar{X}-3S$.

Критерии : ни одно значение не должно превышать $\bar{X}\pm3S$.

Меры: при наличии значения, превышающего $\bar{X}\pm3S$, его отбрасывают и выполняют исследование того же контрольного материала еще в одной серии с последующим новым расчетом $\bar{X}$ и S.

Выверенные таким образом на соответствие установленным нормам точности контрольные пределы могут использоваться для построения контрольной карты для каждого аналита и для каждого контрольного материала.

3 стадия. Цель: оперативный (текущий) контроль качества исследований.

Способ: обязательное выполнение по 1 измерению каждого контрольного материала в каждой аналитической серии.

Критерии: контрольные правила по Westgard.

Меры: при нарушении контрольных правил остановка аналитического процесса, выявление и устранение причин ошибок и повторное выполнение исследований проб пациентов и контрольных проб.

По сравнению с инструкцией по контролю качества 1975 г. новые "Правила..." не только более детально рассматривают процедуру контроля, подразделяя ее на 3 последовательные стадии, но и вводят в качестве обязательного условия коррекцию первоначально получаемых значений внутрисерийной воспроизводимости, общей аналитической вариации и относительного аналитического смещения по единым нормативам точности, установленным впервые в отечественной лабораторной практике. Это новшество должно оказать существенное воздействие на общий уровень точности повседневной аналитической работы во всей лабораторной службе.

Интерпретация результатов контрольных исследований.

Контрольная карта дает возможность в очень наглядной форме своевременно выявить и предотвратить ошибки в выполнении методики и тогда, когда результаты анализов контроля не выходят за принятые границы.

Пример построения контрольной карты для определения хлоридов

Дата	*X*	$\bar{X} - X$	$(\bar{X} - X)^2$	
01.01.75	98	2	4	n = 20
02.01.75	102	2	4	Средняя арифметическая
03.01.75	100	0	0	
04.01.75	101	1	1	
05.01.75	95	5	25	$\bar{X} = \frac{2000}{20} = 100 ммоль/л$
06.01.75	105	5	25	
07.01.75	101	1	1	
08.01.75	99	1	1	
09.01.75	97	3	9	Сумма квадратов отклонений от
10.01.75	100	0	0	среднего:
11.01.75	103	3	9	$(\bar{X} - X) = 122$
12.01.75	99	1	1	Среднеквадратическое отклонение:
13.01.75	102	2	4	

14.01.75	100	0	0	$S = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - X)}{n-1}} = \sqrt{\frac{122}{19}} = 2{,}5$
15.01.75	98	2	4	
16.01.75	104	4	16	
17.01.75	101	1	1	
18.01.75	97	4	16	
19.01.75	99	1	1	
20.01.75	100	0	0	
Всего	2000		122	

Коэффициент вариации

$$CV = \frac{S \times 100}{X} = 2{,}5\%$$

$\bar{X}$ = 100 ммоль/л

$\bar{X}$ + 1S = 100 + 2,5 = 102,5 ммоль/л

$\bar{X}$ + 2S = 100 + 5,0 = 105,0 ммоль/л

$\bar{X}$ + 3S = 100 + 7,5 = 107,5 ммоль/л

$\bar{X}$ – 1S = 100 – 2,5 = 97,5 ммоль/л

$\bar{X}$ – 2S = 100 – 5,0 = 95,0 ммоль/л

$\bar{X}$ – 3S = 100 – 7,5 = 92,5 ммоль/л

Контроль правильности. Сыворотка с исследованным содержанием используется так же, как и неисследованная; различие состоит только в том, что в ней среднюю и среднеквадратическое отклонение определяет производитель и все исследованные значения для каждого теста с указанием метода исследования представлены в паспорте, прилагаемом к сыворотке.исследований. Применение контрольной сыворотки с исследованным содержанием позволяет контролировать правильность результатов, получаемых в лаборатории путем сравнения с целевым значением, указанным в паспорте сыворотки.

Исследование правильности целесообразно проводить в условиях хорошей сходимости результатов. Контроль правильности осуществляет периодически работник лаборатории в следующих случаях:

а) если результаты исследования контрольного материала выходят за пределы ±2S;

б) при налаживании нового метода;

в) при использовании новой измерительной аппаратуры, новой партии реактивов и т.д. При этом следует сделать не менее 10 параллельных

исследований методом, указанным в инструкции, прилагаемой к контрольной сыворотке. Эти же данные могут быть использованы для оценки сходимости. Контроль правильности должен осуществляться во всем диапазоне прямолинейного хода калибровочного графика. Для этого используют контрольную сыворотку с нормальным и патологическим содержанием компонентов.

Статистическим критерием правильности исследований является средняя арифметическая ($\bar{X}$) и степень ее отклонения от истинного (номинального) значения m называемое смещением (bias). Для оценки правильности можно использовать также следующие методы:

1) метод добавки – внесение в биологическую жидкость точно взвешенного количества анализируемого вещества и последующее его определение;

2) метод смешивания проб – в разных соотношениях смешивается биологическая жидкость с низкой и высокой концентрацией компонентов;

3) метод, использующий биожидкости здоровых людей: изменение нормальных показателей отражает изменение правильности определений. Этот метод особенно ценен для оценки правильности всех компонентов, которые отсутствуют или нестабильны в контрольных пробах.

Дополнительным способом выявления небольших систематических погрешностей исследований является метод кумулятивных сумм ("CUSUM"). В основе этого метода контроля лежит расчет отличий результатов исследований контрольных проб от их среднего значения, полученного при начальном этапе контроля (контрольные пробы в первых 20 аналитических сериях). Пока результаты колеблются в пределах $\bar{X} \pm 1S$, правильность исследований под контролем и расчет алгебраической суммы положительных и отрицательных отклонений результатов исследования не производят. При отклонении результата за указанные пределы начинают расчет кумулятивной суммы во всех последующих аналитических сериях, суммируя разности между каждым отдельным значением контрольной пробы и превышенным контрольным пределом. Расчет продолжают до того момента, когда сумма разностей превысит предельную величину, соответствующую 2,7 S, либо пока сумма не поменяет знак. Это служит сигналом для приостановления расчета, так как анализ "вышел из- под контроля" и необходимо принять меры для поиска причины систематической погрешности и ее устранения. При этом результаты исследований проб пациентов не отбрасываются, так как погрешность не очень значительна. При желании отслеживать появление еще меньших систематических погрешностей в качестве контрольных пределов могут быть приняты $\bar{X} \pm 0{,}5S$, а в качестве абсолютной величины

"cusum" 5, 1S. Этот способ удобен при работе на автоматических анализаторах. Метод контроля с помощью кумулятивных сумм может проводиться путем табличного расчета либо путем построения контрольной карты. В отличие от обычной контрольной карты на карте "CUSUM" откладывают значения отклонений результатов исследования проб контрольного материала от контрольного предела.

Контрольные правила и их выбор

Контрольные правила - это пределы погрешностей и процедуры, которые применяются для обнаружения допущенных погрешностей и оценки приемлемости результатов исследований. Правило включает число принимаемых во внимание результатов контрольных проб в одной или нескольких сериях и используемые пределы (число стандартных отклонений от средней) для данного правила, обозначаемого соответствующими символами. Так символ 1: 2S означает, что применено правило, по которому исследуется одна контрольная проба, а контрольными пределами служит диапазон $\bar{X}\pm2S$.

Полезность контрольных правил основывается на двух характеристиках:

- вероятность обнаружения ошибки (Ped)
- вероятность ложного отбрасывания (Pfr)

Обе вероятности могут быть описаны графиками функциональных зависимостей, где на оси у откладываются в % показатели вероятности ошибки, на оси х - статистический размер ошибки (рис.10). Идеальное правило должно бы выявлять клинически значимую ошибку с наивысшей возможной вероятностью, не вызывая ложного отбрасывания серии анализов. Однако, все правила имеют тот или иной недостаток, и поэтому выбор контрольных правил следует осуществлять применительно к поставленной задаче. Нарушение контрольных правил может регистрироваться на контрольных картах Levey-Jennings.

Роль числа контрольных проб для выявления ошибки и вероятности ложного отбрасывания проб можно иллюстрировать сравнив правила с одной и двумя контрольными пробами, т.е. правила 1:2s и 2:2S (рис. 11). В первом случае при наличии систематической ошибки +2s все результаты контрольных проб называются смещенными на две стандартных отклонения. Ped при применении этого правила состави 50% (Рис. 12). При систематической ошибке +4s большая часть результатов находится за контрольным пределом, при этом Ped составит 97.5%.

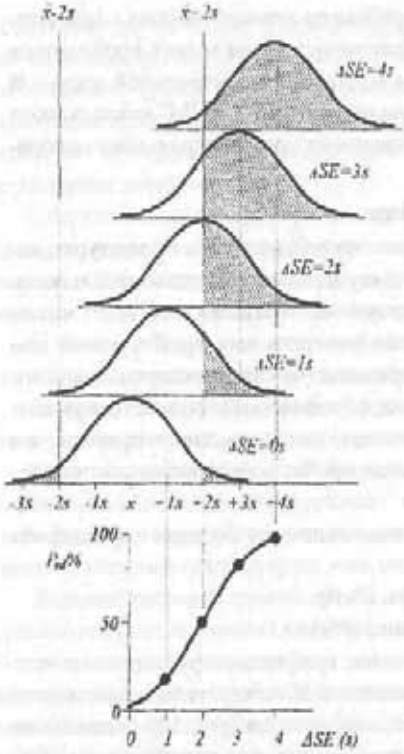


Рис. 10. Повышение вероятности обнаружения систематической погрешности в зависимости от ее размера (по Sorto et al., 1998).

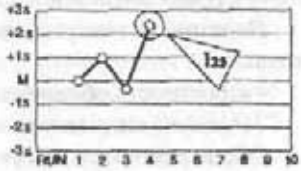


Рис. 11. Схема применения контрольного правила 1:2S.

При росте случайных ошибок ΔRE = 2 означает, что первоначальное стандартное отклонение выросло вдвое. При одном контрольном измерении в пробе вероятность обнаружения такого увеличения стандартного отклонения составит 32% (по 16% в обе стороны кривой распределения результатов) (рис. 13). При увеличении стандартного отклонения в 4 раза вероятность обнаружения ошибки составит 62% (2x31%).

Вероятность ложного отбрасывания при применении контрольного правила 1:2s составляет 5%, т.е. 5% контрольных результатов статистически окажутся вне контрольных пределов даже при хорошем выполнении анализа и могут быть отброшены безосновательно. Однако, этот аргумент нельзя использовать для полного игнорирования сигналов об ошибках, потому что можно в итоге пропустить и действительную ошибку.

При измерении нескольких контрольных проб возрастают как вероятность выявления ошибки, так и вероятность ложного отбрасывания

результатов исследований. При исследовании двух проб или двух исследованиях одной пробы вероятность одного из измерений дать результат за контрольными пределами составит 10% (2 x 1/20 x 19/20, для 5 измерений - 23%; для 10 измерений - 40%; для 20 измерений - 65%.

Контрольное правило 2: 2s расматривается как нарушенное, если каждое из двух результатов при двух последовательных контрольных исследованиях оказываются по одной и той же стороне средней и оба превы-

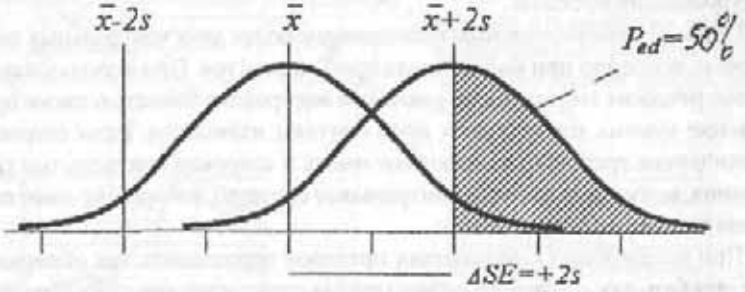


Рис. 12. Вероятность обнаружения систематической погрешности размера +2S при применении контрольного правила 1:2S (по Sorto et al., 1998).

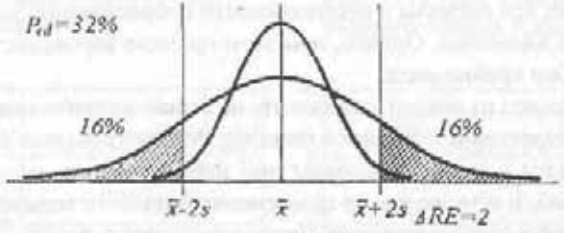


Рис. 13. Вероятность обнаружения случайной погрешности (двукратное увеличение среднего квадратичного отклонения) при применении контрольного правила 1:2S (по Sorto et al., 1998).

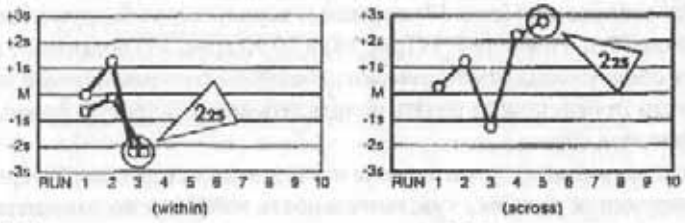


Рис. 14. Схема применения контрольного правила 2:2S.

шают контрольный предел +2s или -2s (рис. 14). По сравнению с правилом 1: 2s как Ped, так и Pfr снижены. При исследовании двух контрольных проб в одной и той же серии вероятность того, что оба результата превысят контрольные пределы, составляет только 0,25% (1/20 x 1/20 = 1/400 = 0,0025) при нормальном выполнении анализа. Систематическая ошибка должна быть размера по меньшей мере 2,5 s, чтобы быть обнаруженной с достаточно высокой вероятностью (70-80%) в первой же серии с двумя контрольными пробами.

Считают нерациональным исследование более двух контрольных проб в серии, особенно при малом числе проб пациентов. При использовании автоматических анализаторов с высокой воспроизводимостью также применение многих контрольных проб считают излишним. Если широкие клинические требования позволяют иметь и широкие контрольные требования, могут применяться контрольные системы, которые не дают сигналов на ложное отбрасывание.

При расширении контрольных пределов вероятность как обнаружения ошибки, так и ложного отбрасывания снижается. (рис.15). При правиле 1 :3s (рис. 16) вероятность ложного отбрасывания только 0, 3% (3 отбрасывания на 1000 измерений). Поскольку ложное отбрасывание едва ли возможно, все сигналы о необходимости отбрасывания должны приниматься во внимание. Однако, при этом правиле вероятность обнаружения ошибки крайне мала.

Как это видно из вышеизложенного, не всякое правило позволяет обнаружить возрастание случайной ошибки. Все контрольные правила нечувствительны к малым ошибкам при использовании менее 4 контрольных проб, и в то же время применение большого количества контрольных проб в повседневном контроле нерационально.

В поисках возможности выявлять малые ошибки было предложено немало различных правил. Так, правило R :4s (различие между наиболее высоким и наиболее низким контрольным результатом превышает 4 стандартных отклонения) (рис. 17) повышает вероятность обнаружения случайной ошибки. Правила 4: 1s (рис.18) и 10 : $\bar{X}$ (рис. 19) повышают вероятность обнаружения статистически небольшой систематической ошибки. В этом случае можно начать исправлять аналитическую процедуру, не отбрасывая серию.

Поскольку контрольные правила имеют неодинаковые характеристики обнаружения ошибок, чувствительность контроля по отношению к ошибкам обоего рода может быть повышена путем применения комби-

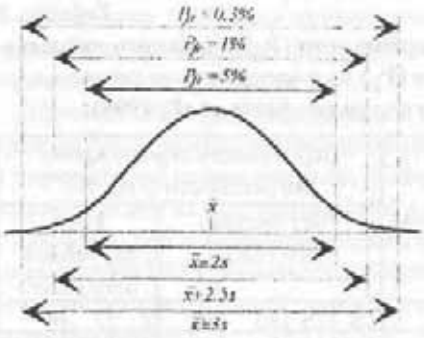


Рис. 15. Вероятность возрастания ложного отбрасывания аналитических серий при расширении контрольных пределов 1:2S (по Sorto et al., 1998).

Рис. 16. Схема применения контрольного правила 1:3S.

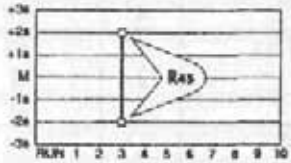


Рис. 17. Схема применения контрольного правила R:4S.

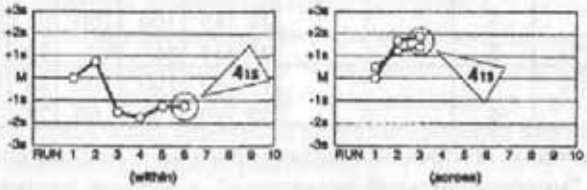


Рис. 18. Схема применения контрольного правила 4:1S.

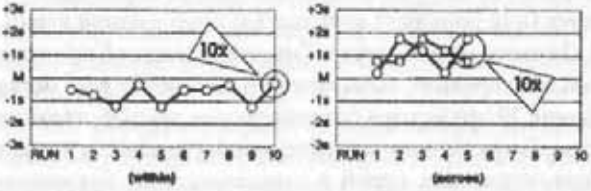


Рис. 19. Схема применения контрольного правила 10:X.

Таблица 29

Вероятность обнаружения погрешности (P_{ed}) и ложного отбрасывания аналитической серии (P_{fr}) при одной или нескольких контрольных пробах в серии (по Sorto et al., 1998)

Контрольное правило	Число проб	Вероятность ложного отбрасывания (Pfr, %)	Вероятность обнаружения погрешности (Ped, %)						
			Рост систем. погр.(ΔRE)				Рост случайной погр.(ΔSE)		
			1S	2S	3S	4S	2	3	4
1:2S	1	5	16	50	84	98	32	50	62
	2	10	30	78	98	100	48	75	80
	4	18	50	93	100	100	78	94	100
1:2,5S	1	<1	6	29	71	93	20	34	48
	2	2	12	57	90	100	33	45	75
	4	4	25	78	100	100	56	84	96
1:3S	1	<1	2	16	53	84	12	32	40
	2	<1	4	22	75	96	21	50	66
	4	1	10	50	93	100	42	78	95
1:3S/2:2S	2	<1	7	41	86	99	28	52	65
	4	2	14	68	98	100	45	82	90
	6	3	21	85	100	100	61	90	98
1:3S/2:2S/	2	1	7	41	86	99	33	58	70
R:4S/4:1S/	4	3	17	80	100	100	58	87	95
10X	6	6	30	90	100	100	78	96	100

нации различных контрольных правил, что и было предложено Westgard в форме "многоправильной процедуры", в которой различные контрольные правила применяются одно за другим : (1 :3s / 2 :2s / R : 4s / 4 : 1s / 10 : $\bar{X}$). "Многоправильная процедура" может быть применена как при одной контрольной пробе в последовательных сериях, так и при исследовании двух (или большего количества) проб в одной серии. При этом правило 1 :2s часто добавляется к "многоправильной процедуре" в качестве сигнального правила, вызывающего включение всех остальных правил. В таблице 29 приведены сравнительные данные, характеризующие вероятность обнаружения аналитической погрешности и ложного отбрасывания аналитических серий в зависимости от применяемых контрольных правил и числа контрольных проб в одной серии.

Приводим трактовку правил, избранных для "многоправильной процедуры", согласно утвержденным Минздравом России нормативным документам.

Правило 1:2S – один контрольный результат выходит за контрольные пределы $\bar{X}\pm2S$, что предупреждает о возможности ошибки как в данной, так и в предыдущей сериях аналитов. "Сигнал тревоги". Необходима проверка результатов других контрольных проб в данной и предшествующей сериях.

Правило 1:3S – выпадение одного контрольного результата за пределы диапазона $\bar{X}\pm3S$ указывает на наличие случайной ошибки и опасность большой систематической ошибки, что может потребовать исключения серии результатов.

Правило 2:2S – выпадение двух последовательных контрольных результатов в одной серии за пределы $\bar{X}\pm2S$ по одну сторону от средней указывает на систематическую ошибку и необходимость исключения всей серии результатов.

Правило 2:2S (между сериями) – выпадение двух последовательных контрольных результатов, полученных в разных сериях, за пределы $\bar{X}$ $\pm2S$ на одной и той же стороне от средней указывает на систематическую ошибку и требует исключения обеих серий результатов.

Правило R:4S – превышение различий между двумя контрольными результатами внутри одной серии размаха 4S отражает наличие случайной ошибки и требует исключения серии результатов.

Правило 4:1S (внутри серии) – выпадение 4 последовательных контрольных результатов за пределы $\bar{X}\pm1S$ по одной стороне от средней указывает на систематическую ошибку. Серия исключается, если смещение результатов клинически значимо. Требуется проверка аналитического прибора и калибратора набора реагентов.

Правило 4:1S (между сериями) – аналогично предыдущему правилу (внутри серии), но учитывает 4 контрольных результата в разных сериях.

Правило 10:$\bar{X}$ (внутри серии) – размещение 10 последовательных контрольных результатов по одной стороне от средней указывает на систематическую ошибку. Исключение серии требуется не всегда, т. к. смещение чаще всего клинически не значимо. Необходима проверка инструмента и калибратора.

Правило 10:$\bar{X}$ (между сериями) – аналогично предыдущему правилу (внутри серии), но учитывает 10 контрольных результатов в двух разных сериях. Существуют варианты правила с учетом от 7 до 12 значений и с разной степенью чувствительности к систематической ошибке.

При ручном выполнении контрольных исследований может оказаться затруднительным использовать "многоправильную процедуру". Если два контроля используется в серии, даже применение первой части правил (1:3s/2:2s) снижает сигналы ложного отбрасывания при хорошем обнаружении ошибок.

При использовании дубликатов измерений аналитическая вариация снижается на корень квадратный из двух.

Хотя контрольные правила, разработанные Westgard (1981), могут применяться и без контрольной карты, в настоящее время они в основном применяются при работе с контрольными картами.

Система применения этих правил приведена в действующих "Правилах внутрилабораторного контроля качества...» (см. в данном томе). Из схемы следует, что обнаружение одного контрольного результата за пределами $\bar{X} \pm 2S$ требует применения других правил в указанной последовательности, что позволяет не допустить представления в клинику ошибочной лабораторной информации, а также не проделывать повторно анализы, результаты которых вызвали сомнение если проверка рядом контрольных правил не выявит наличия серьезной ошибки.

Некоторыми лабораториями используется несколько отличающаяся схема применения контрольных правил.

Предупреждающим о возможности ошибки критерием принимается отклонение контрольного результата за пределы $\bar{X} \pm 2S$.

Тревожными рассматриваются следующие комбинации контрольных результатов.

Система 1 контроля: Правило 13S : 1 контрольный результат отклоняется за пределы $\bar{X} \pm 3S$.

Система 2 контролей: Правило 2:2S : 2 контрольных результата отклонились одновременно по одну сторону за пределы $\bar{X} \pm 2S$ или 2 контрольных результата последовательно отклонились по одну сторону от средней за пределы $\bar{X} \pm 2S$.

Правило R4S: 2 одновременных или 2 последовательных результата отклонились по разные стороны от средней за пределы $\bar{X} \pm 2S$.

Система 3 контролей: Правило 1:3S : 1 контрольный результат отклонился за пределы $\bar{X} \pm 3S$.

Правило (2 из 3) 2S : 2 контрольных результата из 3 в серии отклонились по одну или по разные стороны от средней за пределы $\bar{X} \pm 2S$.

Правило 2 2S : 2 последовательных результата отклонились на один и тот же уровень по одну сторону от средней за предел $\bar{X} \pm 2S$.

Как и в предыдущем случае, эта схема основана на постоянном внимании лабораторных специалистов к оценке качества лабораторных результатов, на скрупулезном выполнении порядка внутрилабораторного контроля качества, что отражает как уровень профессиональной культуры работников лаборатории, так и их действенную ответственность за результаты своего труда, передаваемые в распоряжение клиницистов.

МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ ДАННЫЕ ИСЛЕДОВАНИЙ ПРОБ ПАЦИЕНТОВ (БЕЗ КОНТРОЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ)

К разработке таких методов предрасполагает их сравнительная дешевизна по отношению к методам с применением коммерческих контрольных материалов при возможности детекции различных видов погрешностей, включая и аналитический, и преаналитический этап. Вместе с тем, эти методы "Правилами внутрилабораторного контроля качества количественных лабораторных исследований" расцениваются как дополнительные по отношению к контролю с применением контрольных материалов и допускаются для использования как самостоятельные способы контроля лишь в крайних случаях - при полном отсутствии возможности приобрести контрольные материалы.

Для контроля правильности результатов лабораторных исследований может быть применен метод контроля по ежедневным средним значениям результатов исследований проб пациентов. При проведении этого варианта контроля вначале ежедневно рассчитывается среднее арифметическое значение результатов однородной по численности и составу группы пациентов на протяжении 20 дней. Эти средние значения затем подвергаются статистической обработке по тем же правилам, по каким обрабатывались бы результаты контрольных исследований в 20 первоначальных аналитических сериях. С использованием полученных значений общего среднего и среднего квадратического отклонения строится контрольная карта, на которую впоследствии наносятся ежедневные средние значения результатов исследований соответствующих аналитов. Оценка возможных случайных и систематических погрешностей может проводиться по описанным выше правилам Westgard вручную или с использованием компьютера.

При исследовании контрольного материала выявляется случайная ошибка (San.). На результате исследования пробы пациента, кроме того,

сказывается преаналитическая (Sпреан), внутрииндивидуальная (Sинд) и межиндивидуальная (Sмежинд) биологическая вариация. Следовательно, S^2пац = S^2ан + S^2преан + S^2межинд + S^2инд. Для вычисления числа пациентов Nпац, необходимого для получения величины вариабельности с той же чувствительностью, что и при исследовании контрольного материала, следует использовать уравнение S^2ан = S^2пац/N; или N = S^2пац/S^2ан. Величины биологической вариации могут быть заимствованы из специальной литературы. Sпац может быть рассчитано по формуле Sпац = 0,74 (P0,75; P0,25), где P0,75 представляет собой 75% перцентиль от распределения пациентов. Sан получают в самой лаборатории. Нужно учитывать, что при использовании вместо средней арифметической всех результатов пациентов средней ряда величин без выпадающих за принятые пределы крайних значений, величина сдвига, обусловленного систематической ошибкой, несколько занижается (50%-ный перцентиль). При использовании медианы вместо средней арифметической размер величин по одну из ее сторон не влияет на значение медианы. При этом обычно не применяются пороги отсечения. Стандартное отклонение в этом случае примерно на 20% выше стандартного отклонения при средней арифметической, а аналитическое отклонение прямо отражается на размере отклонения медианы. Многолетний опыт некоторых лабораторий (Rustad P., 1996) показывает, что постоянное применение этого способа позволяет уловить возникновение систематической ошибки не хуже, чем при использовании контрольных материалов.

Еще одним вариантом статистического анализа проб пациентов является метод с использованием критерия Пирсона "кси-квадрат", который с математических позиций более соответствует характеру распределения результатов большинства аналитов, не отвечающему закону нормального распределения. По данным И.С.Балаховского, этот критерий позволяет довольно чувствительно выявлять систематические ошибки и относительно мало зависит от изменения состава пациентов, однако зависит от числа классов, на которые разбита популяция, и от длины аналитической серии.

Контроль воспроизводимости по результатам исследований проб пациентов "Правилами внутрилабораторного контроля качества количественных лабораторных исследований" рекомендуется проводить с исследованием дубликатов, т.е. двух параллельных исследований в выбранной наугад пробе биоматериала пациента в каждой аналитической серии. При этом в каждом случае определяется размах между параллель-

ными результатами и его относительная величина (R) в процентах. Полученные в 20 аналитических сериях значения относительного размаха рассматриваются как основа для расчета среднего арифметического значения, с использованием которого затем рассчитываются 95%-ные и 99%-ные контрольные пределы, служащие, наряду с нулевой линией, для построения контрольной карты. На контрольную карту наносятся значения относительного размаха результатов параллельных исследований случайных проб из каждой аналитической серии. Выпадение одного результата за 99%-ную границу или двух значений за 95%-ную границу свидетельствует о непригодности результатов данной серии. Приводимая методика несколько отличается от применявшейся ранее более более совершенной математической основой.

В литературе разных лет приводились и другие способы контроля качества по результатам исследований проб пациентов. Приводим несколько таких способов без рекомендации их применения.

Исследование смешанной пробы. Оценка воспроизводимости методом смешанной пробы из группы образцов случайно выбирают два - А и В, из каждого образца А и В берут равные обьемы и смешивают (образец С) ; исследуют все три образца (табл. 30).

Процедуру проводят в течение 40 дней, все результаты из последнего столбца складывают, не учитывая знаки, и сумму делят на 40, вычисляя величину среднего отклонения Dср для одного анализа. Используя эту величину, на контрольной карте отмечают горизонтальными линиями пределы 0,845 Dср; 2,5 Dср (~ 2S), 3,5 Dср (~ 3S). (В скобках указано примерное соответствие пределам на карте, построенной по результатам исследований проб контрольного материала).

Метод дельта-контроля состоит в сравнении результата исследования с величинами, полученными ранее при исследовании образцов материала того же пациента. Этот способ позволяет обнаружить как колебания в концентрации аналита, так и ошибочную идентификацию образца.

Таблица 30

Определение воспроизводимости по смешанным пробам

Компонент	*A*	*B*	*C*	*A + B / 2*	*Различие* *
Гемоглобин	12,5	14,2	13,0	13,35	0,35
Гематокрит	47,0	52,0	50,0	49,5	0,5

* Различие между величиной, полученной в смешанной пробе (С) и теоретической величиной А + В / 2.

Особенно полезен при мониторинге исследований, проводимых в процессе лечения.

Особенности контроля качества отдельных видов лабораторных исследований

Различие методических подходов, используемых в различных отраслях клинической лабораторной диагностики, определяет некоторые особенности приготовления контрольных материалов и их использования для контроля качества отдельных видов лабораторных исследований.

Контроль качества исследований мочи. Для контроля правильности и воспроизводимости результатов исследования химического состава мочи используют контрольные материалы, близкие по возможности к образцам мочи пациентов, и контрольные мазки для контроля качества микроскопических исследований осадка мочи. В качестве контрольных материалов используют: водные растворы веществ; слитую мочу с консервантами; искусственные растворы мочи с добавками веществ, исследуемых в моче.

Контрольные препараты для микроскопии осадков мочи должны содержать встречающиеся в моче соли, полиморфные эпителиальные клетки, различные виды цилиндров, лейкоциты, эритроциты, болезнетворные и неболезнетворные бактерии, грибы, животные паразиты. Кроме того, целесообразно иметь препараты с осадками мочи, характерными при некоторых наиболее распространенных заболеваниях.

Приготовление стабильной нативной мочи. К 1 л свежей мочи добавляют 2 г ЭДТА и при тщательном перемешивании приливают 5 мл раствора тимола (100 г тимола на 1 л изопропанола). Через 2 недели мочу центрифугируют для удаления слизи и незначительного количества солей мочевой кислоты. После такой обработки моча становится прозрачной и почти не имеет запаха. Полученный контрольный материал остается стабильным при комнатной температуре .

Приготовление контрольных материалов, имитирующих мочу. Раствор №1: в мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 12,2 мл KH_2PO_4 - 0,37 моль/л; 11,6 мл $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,19 моль/л; 5 мл сыворотки с нормальной концентрацией белка; 1 г глюкозы; 0,5 мл ацетона; 0,1 мл гемолизата и доливают до метки дистиллированной воды. Перемешивают до полного растворения. Полученный контрольный материал хранят при -20°С. Стабилен до 3 мес.

Для получения осадка все добавки промывают в холодном изотоническом растворе хлорида натрия с формалином (0,85 г NaCl +10 мл вод-

ного формалина и доводят до 100 мл дистиллированной водой). Фиксацию продолжают в течение ночи, затем центрифугируют и добавляют в контрольный материал. В качестве добавки для формирования осадка мочи используют следующие фиксированные вещества: эритроциты, лейкоциты светлого слоя кровяного сгустка, пепатогенные E. coli, клетки дрожжей, сперматозоиды, кристаллы цистина (получают путем перекристаллизации из чистого порошка L-цистина), кристаллы трипельфосфатов (берут из проб больных), кристаллы оксалата кальция (берут из проб больных).

Раствор № 2: в мерную колбу вместимостью 2 л вносят хлорид натрия, глюкозу, мочевину и ацетон в количествах, указанных в табл. 31. Приливают 500 мл воды, перемешивают. Микропипеткой вносят 0,2 мл цельной крови с величиной гематокрита от 40 до 45. Для того, чтобы добавить 0,8 г сывороточного белка, используют слитую сыворотку от больных или контрольную сыворотку с известным содержанием белка. Необходимое количество сыворотки Хсыв рассчитывают следующим образом:

$$X_{сыв} = \frac{100 \times 0,8}{X_{бел}};$$

где Хбел - содержание белка в используемой сыворотке.

Если используемая сыворотка содержит 7,5 г/л белка, то объем сыворотки, содержащий 0, 8 г белка, будет равен:

$$\frac{1000}{7,5} \times 0,8 = 106,6 \text{ мл}$$

Затем приливают дистиллированную воду до метки и хорошо перемешивают. Для консервации в раствор добавляют 5 мл хлороформа. Хлороформ является хорошим консервантом для этих контрольных растворов. Другие консерванты могут интерферировать в одной или в нескольких реакциях. Срок годности раствора - около 1 года.

Мочевой контроль для токсикологического исследования можно приготовить следующим образом.

1. Отбирают суточные пробы больных, не курящих и не принимающих лекарств, и собирают слив объемом до 10 л. Хранят при температуре от 4 до 7°С.

2. Фильтруют через стеклянную вату для исключения посторонних примесей.

Таблица 31

Перечень веществ и их концентрация в контрольных растворах мочи

Вещество	*Добавляемое количество вещества*	*Концентрация веществ в контрольном растворе (мг%)*	
		в положит.	*в отрицат.*
NaCl	10 г	-	-
Мочевина	10 г	3 ммоль/л	43 ммоль/л
Глюкоза	1 г	2,775 ммоль/л	1,48 ммоль/л
Белок	0,8 г	0,4 г/л	0,2 г/л
Гемоглобин (скрытая кровь)	220 мкл	Реакция положительная	Реакция отрицательная
Ацетон	4 мл	То же	То же

3. Исследуют часть сливной мочи на наиболее часто применяемые лекарства, которые определяют в лаборатории. Слив используют в случае отрицательной реакции.

4. К сливу мочи добавляют морфина гидрохлорида, кодеина фосфата, хинина гидрохлорид, метадона гидрохлорид глютетимид - по 20 мг каждого и 30 мг амфетамина. Перед добавлением в слив глютетимида его нужно растворить в 3 мл абсолютного этанола.

5. Хорошо смешать и разлить по 10 - 15 мл в пузырьки. Хранить при -20°С. Такие сливы стабильны 8 мес.

6. Для использования в качестве контрольного материала содержимое пузырька оттаивают и исследуют вместе с неизвестными образцами мочи.

Контроль качества гематологических исследований. Для контроля качества определений гемоглобина применяются следующие препараты:

1. Стандартный раствор гемоглобина с известной концентрацией.

2. Стерильный раствор гемолизата (консервированная кровь). Для приготовления контрольного раствора необходимо осуществить следующее:

а) отцентрифугировать 200 мл цитратной крови для осаждения клеток, удалить супернатантную плазму;

б) добавить 100 мл дистиллированной стерильной воды и встряхивать смесь на механической мешалке около "0 мин;

в) поставить полученный раствор в глубокую заморозку (не ниже -20°С) на ночь;

г) на следующий день оттаять;

д) снова хорошо перемешать на мешалке 30 мин;

е) слить раствор через фильтр Millipore в стерильный сосуд;

ж) разлить по 1 мл в стерильные пузырьки и заморозить при -20°С.

В целом вся процедура приготовления должна проводиться в стерильных условиях. Стерильный раствор гемолизата стабилен около года. Раствор используют для контроля воспроизводимости исследований гемоглобина.

3. Консервированная кровь с фиксированными клетками крови или раствор с искусственными частицами, имитирующими клетки крови (для контроля качества подсчета клеток крови).

4. Контрольные мазки (окрашенные и не окрашенные) с нормально: и патологической лейкоцитарной формулой (для контроля качества подсчета лейкоцитарной формулы).

Мазки многократно просчитываются квалифицированными специалистами (не менее 20 раз). Из полученных данных рассчитывают статистические критерии определения точности подсчета мазка. Для удлинения срока хранения мазков используют клей БФ-6, который обладает свойством образовывать тонкую прозрачную пленку, герметически приклеивающуюся к поверхности мазка и стекла и предохраняющую препарат от внешних воздействий. Предложена методика приготовления мазков на отмытой рентгеновской пленке, нарезанной по размеру предметного стекла. Мазки, приготовленные таким образом, можно пересылать в конверте, что весьма удобно при проведении межлабораторного контроля качества подсчета лейкоцитарной формулы.

Контроль качества цитологических исследований.

При цитологических исследованиях определение доброкачественного или злокачественного характера процесса, а также его гистотипа производится на основании качественной оценки многообразных проявлений морфологической структуры патологического процесса и во многом зависит от субъективного восприятия выявленных цитологических изменений и от опыта исследователя. Одним из практических путей ограничения субъективной вариации является тщательная стандартизация методов препарирования и использование соответствующих контрольных препаратов.

Хотя использование секционного материала с известным содержанием составляющих элементов должно быть обязательным, эти контрольные препараты не дают возможности дать заключение о качестве результата. Несмотря на то, что исследуемый секционный материал и контрольный препарат должны исследоваться идентично, во многих методах индиви-

дуальное внимание, уделяемое каждому срезу, препятствует этому (например, при дифференциации). Выбор пригодного контрольного материала должен быть обоснованным: например, для того, чтобы использовать срезы от центральной нервной системы для контроля окраски периферических нервов, материал должен быть небольшого размера. Требуется очень большая тщательность даже при оценке объективных иммуноцитохимических методов, где результаты сами по себе могут иметь диагностическое значение. Каждая стадия реакции должна контролироваться соответствующей положительной сывороткой, отрицательной блокирующей сывороткой и заменяющими реактивами с буферами.

При двухступенчатых исследованиях (лаборант – врач) рекомендуются следующие формы внутреннего контроля качества:

1. Периодический выборочный просмотр врачом всех препаратов, расцененных лаборантом как "нормальные".

2. Периодический быстрый просмотр врачом всех препаратов после лаборанта за рабочий день.

3. "Подкладывание" в материал, поступающий для исследования, препаратов с ранее выявленной патологией (метод повторной пробы) с целью определить способность лаборанта правильно их оценить.

Общепризнанным и широко используемым методом контроля качества всех цитологических исследований является сопоставление их результатов с данными гистологических исследований и клинического течения заболевания, в ряде случаев с параллельным пересмотром цитологических и гистологических препаратов.

Основными показателями качества цитологических исследований являются: чувствительность (процент правильных цитологических заключений относительно злокачественного процесса), специфичность (процент правильных отрицательных цитологических заключений), процент ложноположительных и ложноотрицательных заключений. Необходимо заметить, что эти показатели различны при поражениях разных локализаций, как и возможности цитологических методов исследований.

Для ежедневного контроля качества в европейских странах разработаны следующие формы:

1. Пересмотр 10% произвольно отобранных "отрицательных" мазков.
2. Быстрый пересмотр всех "отрицательных" мазков.
3. Автоматизированный пересмотр мазков.
4. Пересмотр предыдущих мазков от одной пациентки.
5. Гистологические сопоставления в случаях выполнения биопсии.

Взамен пересмотра произвольно выбранных мазков используют "уровень ложноотрицательных заключений" как эквивалент чувствительности, отражающий вероятность выявления патологических изменений:

$$\text{чувствительность} = \frac{\text{число ложноотрицательных мазков}}{\text{число истинно положит.} + \text{число ложноотрицат.}}$$

Второй метод заключается в пересмотре всех отрицательных и неполноценных мазков опытным лаборантом, который пересматривает под малым увеличением мазки, затрачивая на каждый мазок около 1, 5 мин. Считают, что метод достаточно эффективен, однако требует больших затрат времени и денежных средств.

Автоматизированный пересмотр мазков предполагает использование полуавтоматизированной системы скрининга "Pamet" на основе компьютерной системы анализа изображения, использующей принцип искусственного интеллекта; отбираются измененные клетки в окрашенных стандартных многослойных мазках. Система была разработана для первичного скрининга и предполагает участие лаборанта в принятии решения. Система способна также играть важную роль для оценки качества путем пересмотра отрицательных мазков. Правила контроля цитологических исследований для российских лабораторий - в стадии разработки.

Обеспечение качества микробиологических исследований

Как и в других лабораторных дисциплинах, методы контроля качества существенны в клинической микробиологической лаборатории для обеспечения правильности и воспроизводимости выполняемых тестов: выделения и идентификации клинически важных микроорганизмов, серологических методов, исследования чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и др. исследований. Способ собирания образца, безопасность транспортировки его в лабораторию, качество используемых питательных сред, индикаторов, сывороток представляют собой те факторы, от которых зависит полнота выявления микроорганизмов, их идентификация и клиническая значимость микробиологического исследования. Для оценки качества работы бактериологических лабораторий общепринято применять также такие показатели, как процент высеваемости и бактериологического подтверждения клинического диагноза, процент отрицательных результатов в 1-е и 2-е сутки исследования, процент отрицательных анализов с дополнительным изучением выделенных культур и процент положительных анализов. Однако необходимо иметь в виду, что эти показатели, характеризующие каче-

ство работы лабораторий с точки зрения клинической полезности, зависят от уровня заболеваемости на той территории, где функционирует данная лаборатория, качества клинической диагностики, сроков госпитализации больных, качества взятия материала, времени его транспортировки и др. Эти показатели, таким образом, могут быть использованы для сравнительной оценки качества работы лабораторий, находящихся примерно в одинаковых условиях.

Важным критерием качества микробиологического теста является его способность давать информацию для профилактики и лечения инфекционных болезней, что определяет его клиническую значимость.

Другими критериями качества являются:

– Правильность

а) для тестов с количественным выражением результатов надежность характеризуется близостью результатов к истинной величине (например, при исследовании антибиотиков в сыворотке) ;

б) для тестов с качественным выражением результатов надежность определяет, правилен ли результат (например, идентификация микроорганизмов, исследование чувствительности микроорганизмов к антибиотикам) ;

в) для правильности выдаваемого результата важно использовать стандартную терминологию для микроорганизмов.

Например,

– Staphylococcus aureus, но не "патогенный Staphylococcus"

– Streptococcus pyogenes, но не "гемолитический Streptococcus"

г) использовать унифицированные утвержденные методы.

– Воспроизводимость

Воспроизводимость микробиологических тестов ограничена двумя факторами:

а) недостаточной гомогенностью образца биоматериала.

Проба пациента может содержать много микроорганизмов. Повторное культивирование может выделить разные штаммы.

б) недостаточной стабильностью

С течением времени микроорганизмы в образце размножаются или гибнут с разной скоростью. Здесь также повторное культивирование может выделить разные штаммы. Из этого следует, что для улучшения точности образцы следует исследовать как можно быстрее после взятия.

– Эффективность

Эффективность микробиологического теста - это его способность да-

вать правильный диагноз патологии или патологического окружения. Она измеряется двумя характеристиками:

а) чувствительностью

$$\text{чувствительность} = \frac{\text{число положительных результатов}}{\text{число инфицированных больных}}$$

Чем выше чувствительность теста, тем меньше ошибочных отрицательных результатов.

б) Специфичностью

$$\text{специфичность} = \frac{\text{число отрицательных результатов}}{\text{число неинфицированных больных}}$$

Чем выше специфичность теста, тем меньше число ошибочных положительных результатов.

Из-за различия в условиях работы сложно рекомендовать единую программу внутрилабораторного контроля качества бактериологических исследований. Однако каждой лаборатории необходимо всегда иметь в виду следующие аспекты в своей работе.

1. Контролировать диски с антибиотиками, используя стандартные штаммы, такие как:

а) Staphylococcus aureus (NCTC 6571) для системных штаммов;

б) Esch. coli (NCTC 10418) для штаммов из мочи

в) род Pseudomonas с известной чувствительностью (NCTC 10662) для устойчивых штаммов.

2. Исследовать стерильность сред для выращивания культур путем инкубации пробы на среде в течение суток.

3. Для контроля характеристики роста использовать стандартные культуры:

а) группы Salmonella и Shigella для деоксихолатцитратного агара;

б) Staphylococci и Haemolytic streptococci для чашек с кровяным агаром;

в) Diphtheria со средой Hoyle.

4. Для контроля анаэробной дисгармонии использовать химические и бактериологические методы. Уменьшение метиленового голубого является химическим методом, а для бактериологического контроля исследуется Clostridium tetani.

5. Исследование автоклава может быть химическим с использованием, например, пробирок Brown, в которых происходит изменение цвета от красного до зеленого, или контролем прокладки, которая при температуре 121°С изменяется от белой до коричневой. Бакисследование предполагает раз-

мещение в автоклаве спор, таких как Bacillus stearothermophilus. Затем их переносят в декстрозо-триптонный бульон и инкубируют 5 дней при 56°С, роста не должно быть. Такие споры погибают в течение 15 мин при 121°С.

6. Контроль окрашивания краской Ziehl Nielson осуществляется с использованием кислотоустойчивых бацилл.

7. Для всех серологических тестов использовать доступные положительные и отрицательные контроли.

8. Каждый день контролировать состояние оптики соответствующих приборов.

9. Изредка в работу должны вводиться "слепые" образцы, о природе и источнике которых аналитик ничего не знает.

10. Каждая бактериологическая лаборатория должна систематически участвовать в программе внешней оценки качества исследований. Правила контроля качества микробиологических исследований для российских лабораторий - в стадии разработки.

Контроль качества работы лаборантов

Оценка качества работы лаборантов должна быть частью программы внутрилабораторного контроля качества. Могут быть использованы следующие методы: I) использование результатов межлабораторного контроля качества; 2) метод дублированных анализов; 3) метод случайных проб; 4) метод разведения; 5) использование результатов внутрилабораторного контроля качества. Методы перечислены в порядке возрастания времени, затрачиваемого на каждый метод заведующим лабораторией. Методы 1 и 2 можно использовать почти во всех лабораториях без особых трудностей и больших расходов.

Лаборатории, участвующие в межлабораторных экспериментах по контролю качества исследований, могут использовать результаты контроля для оценки работы лаборантов. Метод зависит от расчета правильности всех определений, выполненных лаборантами в контрольном материале в течение определенного промежутка времени. Нельзя делать выводы о качестве работы лаборанта на основании одного анализа. Однако, если лаборант выполнил 10 или 20 анализов, то есть возможность оценить работу лаборанта на основании аналитических результатов, если истинная величина проб известна. Среднеквадратическое отклонение лаборатории, рассчитанное контрольным центром, можно рассматривать как отражение способности лаборанта производить правильные анализы. Это особенно верно, когда рассчитывают среднюю арифметическую всех среднеквадратических отклонений для всех тестов. Эта средняя ариф-

метическая может быть названа как комбинированное среднеквадратическое отклонение (KS). Величину KS рассчитывают за определенный отрезок времени (полгода, год) для каждого лаборанта и дают грубую оценку аналитической способности каждого.

Лаборатория фиксирует результаты анализов контрольных материалов за определенный промежуток времени, идентифицируя каждый тест с именем лаборанта, который выполнял тест. После истечения установленного срока приготовляют оценочные листы для каждого лаборанта, как показано в табл. 32.

На оценочном листе регистрируют название теста, выполняемого лаборантом, полученный им результат, истинное значение и среднеквадратическое отклонение, сообщаемое контрольным центром. Из этих величин рассчитывают разницу между истинной величиной и полученной лаборантом и делят на среднеквадратическое отклонение. Затем рассчитывают комбинированное среднеквадратическое отклонение, которое является средней всех среднеквадратических отклонений. Как видно из табл. 17, лаборант А в первой пробе для натрия получил результат 132 ммоль/л. Средняя величина, сообщенная контрольным центром, равна 132,7 ммоль/л. Среднеквадратическое отклонение среди участников контроля – 1,7 ммоль/л. Чтобы рассчитать S лаборанта А., нужно решить следующее уравнение:

$$\frac{132 - 132,7}{1,7} = -0,4$$

Число, полученное в последнем столбце, показывает, что величина, полученная лаборантом А, на 0,4 единицы S меньше истинной величины (если допустить, что средняя контроля есть истинная величина). Отрицательные знаки в последнем столбце игнорируют.

Величина KS указывает на способность лаборанта выполнить лабораторные исследования с хорошей точностью. Чем ниже величина KS, тем лучше работа лаборанта. Величину KS можно использовать для ранжирования лаборантов по качеству работы. Величину KS от 0 до 0,5 можно считать очень хорошей, от 0,5 до 1 – хорошей, от 1 до 1,5 – допустимой, от 1,5 до 2 – плохой и выше 2 – очень плохой.

Первым требованием для применения метода является обязательное участие лаборатории во всех программах межлабораторного контроля качества, чтобы каждый лаборант имел возможность выполнить не менее 10 тестов в контрольной сыворотке за год. Во-вторых, этот

Таблица 32

Результаты исследования контрольной сыворотки лаборантом А за 1 год

Тесты ммоль/л	*Результат лаборанта,*	*X*	*S*	*S*
		внешнего контроля лаборанта		
Натрий	132	132,7	1,7	-0,4
	133	135,3	1,8	-1,3
Калий	3,9	3,81	0,11	+0,8
	4,1	4,11	0,13	-0,1

метод менее перспективен в полностью автоматизированных лабораториях. В-третьих, заведующий лабораторией должен гарантировать качество оборудования и реактивов. Чтобы использовать этот метод, лаборатория должна внедрить программу контроля качества исследований внутри своей лаборатории. При ранжировании лаборантов нужно, чтобы число исследуемых тестов, выполняемых лаборантами, было равнозначным.

Для сравнения качества работы лаборантов можно использовать результаты дублированных анализов. Принцип метода состоит в следующем: разница между результатами дублированных анализов обратно пропорциональна качеству выполнения лаборантом исследований. Лучшие лаборанты получают, как правило, небольшую разницу между результатами дублированных анализов, тогда как менее старательные получают большую разницу.

Если d1, d2, d3, d4... dn представляют разницу между результатами дублированных определений в пробах 1, 2, 3, 4... n, то среднеквадратическое отклонение определений можно рассчитать следующим уравнением:

$$S = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}};$$

где d – разница между результатами дублированных анализов; n – число анализируемых проб; 2n – общее число анализов.

Рассчитанное среднеквадратическое отклонение характеризует аналитическую ошибку, присущую самому методу исследования, и ошибку лаборанта. Другими словами, величина среднеквадратического отклонения обратно пропорциональна квалификации лаборанта. Этот метод оцен-

можно использовать только для сравнения качества работы лаборантов, но нельзя использовать для ранжирования, так как невозможно точно сказать, какое среднеквадратическое отклонение лучше.

Метод случайной пробы похож на предыдущий. Вместо анализа всех проб в дубликате каждый лаборант анализирует одну или две пробы в дубликате за неделю. Эти пробы выбираются случайно заведующим лабораторией, без ведома лаборанта. Результаты дублированных анализов, выполняемые каждым лаборантом, заносят в таблицу за определенный промежуток времени, после чего для каждого лаборанта рассчитывают среднеквадратическое отклонение, значения которых заносят в таблицу против каждого лаборанта. Оценка техники исследования такая же, как в предыдущем методе.

В небольших лабораториях, где исследуют менее 10 проб на один тест, трудно выбрать случайную пробу без ведома лаборанта. В таких случаях используют метод разведения, который состоит из выбора случайной пробы и разведения ее водой или нормальным изотоническим раствором хлорида натрия. Лучше растворять пробу не более чем на 20%. Пробы, приготовленные таким образом, под вымышленным именем передают лаборанту для исследования. Результаты заносят в таблицу, как в методе случайных проб, рассчитывают среднеквадратическое отклонение в целях оценки качества работы лаборантов и затем высчитывают разницу между полученной и ожидаемой величиной для разведенной сыворотки.

Другой вариант того же метода – использование двух проб сыворотки больных, смешанных 1:1. Для расчета среднеквадратического отклонения используют разницу между расчетной и аналитической величиной. Для смешивания и разведения может быть также использована ежедневная контрольная сыворотка.

Результаты исследования контрольной сыворотки с известным содержанием компонентов, проводимого в соответствии с программой внутрилабораторного контроля качества исследований, можно собрать за определенный отрезок времени и таким же образом, как и результаты межлабораторного контроля, использовать как способ оценки качества работы лаборантов. В паспорте к сыворотке содержится средняя величина и среднеквадратическое отклонение. После исследования этой сыворотки в лаборатории можно рассчитать величину S для лаборанта, используя S из паспорта.

Например, лаборант при исследовании холестерина в сыворотке получил результат 4,7 ммоль/л. В паспорте к сыворотке даны следующие значения: X = 4,8 ммоль/л, S = 0,13 ммоль/л при использовании того же

метода, разница между полученным и паспортным значением составит: 4,8 – 4,7 = 0,1 ммоль/л

$$S_{лаборанты} = \frac{0,1}{0,13} = 0,7$$

Из среднеквадратических отклонений, высчитанных за определенный промежуток времени, рассчитывают KS, которые затем можно использовать для ранжирования и оценки качества работы лаборантов.

Внешняя оценка качества лабораторных исследований

Внешняя оценка качества лабораторных исследований, или межлабораторный контроль качества, является важным элементом всеобщего обеспечения качества работы лаборатории.

ВОК представляет собой систему объективной проверки результатов лабораторных исследований, осуществляемой внешней организацией. Проверка носит ретроспективный характер. Основная цель ВОК не проверка сопоставимости повседневно получаемых данной лабораторией результатов, а обеспечение сравнимости результатов, получаемых в разных лабораториях для повышения уровня медицинского обслуживания граждан путем улучшения работы лабораторий. Национальная программа ВОК может способствовать этому: а) обеспечивая обучение и подготовку персонала, оказывая содействие менее оснащенным лабораториям, или б) применяя санкции в отношении лабораторий, в которых неудовлетворительная постановка дела не позволяет достигать желаемых результатов. Большинство стран предпочитают первый из этих подходов; однако, некоторые из них настаивают также на общем повышении уровня лабораторных исследований путем применения санкций юридического, финансового или профессионального характера к лабораториям, в которых в результате ВОК была выявлена плохая работа.

Осуществление программ ВОК дает возможность оценить один или несколько следующих аспектов:

– качество аналитического исследования в индивидуальной лаборатории-участнице,

– мастерство исследований лабораторий-участниц,

– внутрилабораторную воспроизводимость,

– межлабораторную воспроизводимость,

– корреляцию между калибровочной процедурой и аналитическими результатами,

– корреляцию между коммерческими реактивами и аналитическими результатами,

– корреляцию между аналитическими приборами и аналитическими результатами,

– систематические отклонения результатов индивидуальных лабораторий от аттестованных значений контрольного материала.

Международные организации ISO и IUPAC разработали несколько руководств по осуществлению ВОК, например, ISO 5725 или ISO/IEC руководство 43. Программы ВОК содержат следующие элементы:

а) выбор подходящего контрольного материала для исследований,

б) рассылка материала в лаборатории, участвующие в контроле (в посылке должна быть инструкция по его использованию),

в) исследование материала в лабораториях,

г) сбор результатов исследования, информация о методах исследования, приборах,

д) установление критериев оценки (паспортные данные к контрольному материалу, аттестация контрольного материала в референтных лабораториях, средняя величина результатов участников) и статистическая обработка полученных результатов исследований,

е) рассылка результатов оценки качества исследований в лаборатории. Бланк оценки может содержать анализ качества индивидуальных лабораторий, и рекомендации по выявлению и устранению причин ошибочных результатов.

По принципу установления критерия оценки, т.е. значений величин в контрольном материале, выделяют два подхода к организации ВОК. Первый из них основан на определении должной величины ("целевых" значений аналитов), которая при определении референтным методом в одной или нескольких референтных лабораториях довольно близка к "истинной величине". Второй предусматривает расчет "целевого значения" на основе статистической обработки результатов, полученных в лабораториях-участниках по метод-зависимым группам. Референтный принцип переносит центр ответственности на референтную лабораторию. Принцип рассчитанного значения ориентирован на реальный уровень точности исследований в лабораториях, выполняющих анализ контрольного материала, и обусловлен наличием как референтных лабораторий, так и референтных методов для аналитов, включенных в программу контроля. Второй подход связан с необходимостью участия большого числа лабораторий для обеспечения более высокой статистической достоверности значения "целевой" ве-

личины по отдельным метод-зависимым группам. На практике во многих странах системы ВОК построены на комбинации обоих подходов.Такой же дуализм свойственен и определению приемлемости результатов.

В настоящее время доступно участие лабораторий в различных программах ВОК: международных, национальных, региональных. Некоторые из этих программ носят официальный государственный характер, другие имеют поддержку профессиональных обществ, третьи являются коммерческими. Во всех программах внешняя оценка качества осуществляется путем рассылки в лаборатории-участники идентичных порций одного и того же контрольного материала с неизвестным работникам лабораторий содержанием контролируемых компонентов. Обычно используется 2 - 3 образца с различными уровнями содержания аналитов. Для различных видов исследований разрабатываются программы, специфичные для объектов и предметов исследований.

Анализ контрольных проб должен включаться в обычный ход работы лабораторий, производиться тем же персоналом, который выполняет повседневные исследования, и теми же методами, которые лаборатория использует в повседневной практике.

Статистическая обработка результатов исследования участвующих лабораторий осуществляется организацией, проводящей внешнюю оценку качества. Основная цель статистической обработки - определение пределов выполнения контрольных исследований и выявление систематических и случайных ошибок. Обработка результатов позволяет как выявлять погрешности, допущенные в работе лабораторий, так и оценивать сравнимость участвующих лабораторий. Для этого производят следующее:

1. Результаты группируют по методам, используемым для определения того или иного компонента, и по типу системы (ручной или автоматической). Цель – снизить до минимума влияние различия самих методов и иметь возможность сравнения этих методов.

2. В каждой группе рассчитывают: $\bar{X}$ – среднюю арифметическую величину; S – среднеквадратическое отклонение. Рассчитывают пределы $\bar{X}\pm2S$.

3. Применяют метод исключения: все результаты, попавшие за пределы $\bar{X}\pm2S$, исключают из дальнейших расчетов, а остальные служат для повторного вычисления новых средней арифметической и среднеквадратического отклонения ($\bar{X}_1$ и S_1).

4. Если после повторного пересчета найдутся результаты вне пределов $\bar{X}_1 \pm 2S_1$, то их также исключают, как и в первый раз. Исключение и пересчет $\bar{X}$ и S повторяют до тех пор, пока во всем массиве не будет ни одного результата, выходящего за допустимые пределы $\bar{X}n \pm 2Sn$.

Вычисленные после окончательного исключения средняя арифметическая и среднеквадратическое отклонение множества результатов служат для оценки сравнимости всех лабораторий в целом, а также для отдельных лабораторий (в случае, когда используется материал с неисследованным содержанием компонентов) (табл.33).

$\bar{X} = 81$; $S = 17{,}3$; $\bar{X} + 2S = 115{,}6$; $\bar{X} - 2S = 46{,}4$. Исключаем два значения: под № 3 и 4, так как они выходят за пределы $\bar{X} \pm 2S$. Снова пересчитываем: $\bar{X}_1 = 85{,}6$; $S_1 = 11{,}1$; $\bar{X}_1 \pm 2S_1 = 107{,}8$; $\bar{X}_1 - 2S_1 = 63{,}4$. Результатов, выходящих за пределы $\bar{X}_1 \pm 2S_1$, больше нет; следовательно, исключений далее производить не надо, а вычисленные в последний раз $\bar{X}_1$ и S_1 можно использовать для дальнейшей оценки результатов.

Оценка отдельных лабораторий. Результаты, полученные из каждой лаборатории, оценивают по отдельным параметрам путем сравнения их значений с допускаемыми пределами $\bar{X} \pm 2S$, рассчитанными для всего множества результатов после окончательного исключения. Критерием оценки могут служить также паспортные данные контрольного материала и результаты референтной лаборатории. По результатам контроля можно определить частоту использования разных методов исследования и сравнить их воспроизводимость.

Для количественной оценки качества результатов отдельных лабораторий результат каждой лаборатории иногда выражают в единицах среднеквадратического отклонения по формуле:

$$IS = \frac{\bar{X}_{лаб} - \bar{X}_{множ}}{S_{множ}}$$

где IS – индекс среднеквадратического отклонения; $\bar{X}$лаб – результат данной лаборатории; $\bar{X}$множ – среднеарифметическая величина, полученная для множества результатов исследуемого компонента после последнего исключения; Sмножс – значение среднеквадратического отклонения для множества результатов (после исключения).

Использовалась следующая градация оценки по величине IS:

$0 = IS < 1$ – результат хороший;

$1 = IS < 2$ – результат удовлетворительный;

Таблица 33

Пример расчета и исключения результатов, полученных лабораториями

№ п/п	*Содержание глюкозы в контр. образце (мг в 100 мл)*	*№п/п*	*Содержание глюкозы в контр. образце (мг в 100 мл)*
1	75	14	89,0
2	70	15	72,0
3	34	16	76,0
4	33	17	76,0
5	98	18	83,0
6	82	19	82,0
7	94	20	102,3
8	89	21	99,1
9	76	22	73,6
10	88	23	63,6
11	92	24	103,5
12	86	25	103,5
13	87		

IS > 2 – результат непригоден.

Чем ближе величина IS к нулю, тем лучше сравнимость лаборатории с другими участниками, тем лучше качество результатов. Указывая результаты, выраженные в IS для отдельных лабораторий и компонентов, можно классифицировать все участвующие лаборатории по качеству выполнения контрольных исследований. В настоящее время этот способ уступил место более точным.

В большинстве систем внешней оценки качества используют сравнение результатов по коэффициенту вариации. При этом желательные уровни точности исследований устанавливают либо в качестве фиксированных пределов, основанных на биологической вариации, на мнении экспертов, на фиксированном достигнутом уровне точности или на комбинации этих подходов, либо в виде вариабельных пределов, зависящих только от реальных колебаний результатов в данной группе лабораторий в данном цикле внешнего контроля. Из 21европейской страны первый вариант используется в 13 странах, второй - в 8. При этом от страны к стране критерии оценки весьма различаются, что поставило

проблему "гармонизации" подходов к оценке качества исследований, причем рабочая группа европейских экспертов высказалась за принцип фиксированных пределов на основе данных о биологической вариации отдельных аналитов. Поскольку при внешней оценке качества приходится в большинстве случаев опираться на результаты единичных проб контрольных материалов, которые могут отклоняться от целевого значения под влиянием как систематической, так и случайной погрешности, европейская группа лабораторных экспертов предложила для расчета желательного предела отклонения единичного результата исследования контрольной пробы от целевого значения (D%) следующее неравенство:

$D < K \times 0{,}5CV_i + 0{,}25\,(CV_i^2 + CV_g^2)^{1/2}$

где = 1,65 или 2,33 для 95% или 99% доверительного интервала

CV_i = среднему коэффициенту внутрииндивидуальной биологической вариации

CVg= среднему коэффициенту межиндивидуальной биологической вариации.

При использовании этого подхода максимально допустимые отклонения единичного результата исследования контрольной пробы от целевого значения должны соответствовать данным таблицы 34

Опыт показывает, что лишь в очень немногих странах лаборатории способны достичь таких жестких пределов межлабораторной вариации, которые в приведенной таблице указаны для натрия, хлоридов, кальция и альбумина, однако объективная обоснованность этих уровней точности, вытекающая из данных о биологической вариации этих аналитов, должна приглашать разработчиков и производителей аппаратуры, методов исследования и наборов реагентов к разработке соответствующих этим требованиям средств и методов анализа.

Метод Юдена. Кроме статистической обработки, возможно графическое изображение результатов межлабораторного исследования, которое позволяет лаборатории сравнить свои данные с результатами референтных лабораторий, а также дает некоторое представление о том, какого рода ошибки допущены в методике, если результаты непригодны. Для понимания графика не требуется особых статистических расчетов, но для практического его использования каждой лаборатории необходимо определить компонент в двух контрольных образцах (например, А и В). Методика построения графика Юдена представлена на рис.20. Строят систему координат, на оси абсцисс откладывают действительное значе-

Таблица 34

Аналиты	*Отклонения (в %)*
Натрий	0,90
Хлор	2,13
Кальций	2,80
Магний	4,16
Альбумин	4,36
Общий белок	4,8
Глюкоза	7,0
Калий	7,2
Креатинин	7,9
Холестерин	10,4
Неорганические фосфаты	12,4
Литий	12,6
ЛДГ	13,2
Мочевая кислота	13,8
Щелочная фосфатаза	14,3
Амилаза	15,1
Мочевина	20,8
Аспартат аминотрансфераза	23,1
Гамма-Глютамилтрансфераза	29,2
Билирубин	36,2
Триглицериды	42,6
Аланин аминотрансфераза	45,3
Железо	45,9
Креатинкиназа	68,0

ние компонента и интервалы среднеквадратического отклонения (±2S) для пробы А, на оси ординат - те же показатели для пробы В. Действительные значения компонентов и среднеквадратического отклонения берут из паспорта к контрольному материалу. Если используется контрольный материал с неисследованным содержанием компонентов, в качестве действительных величин используют X и S множества после исключений. Из двух точек X и Y, представляющих действительные значения компонента для пробы А и В соответственно, проводят две взаимноперпендикулярные прямые. Из точки пересечения прямых проводят окружность с радиусом, равным 2S. Прямую линию W проводят под углом

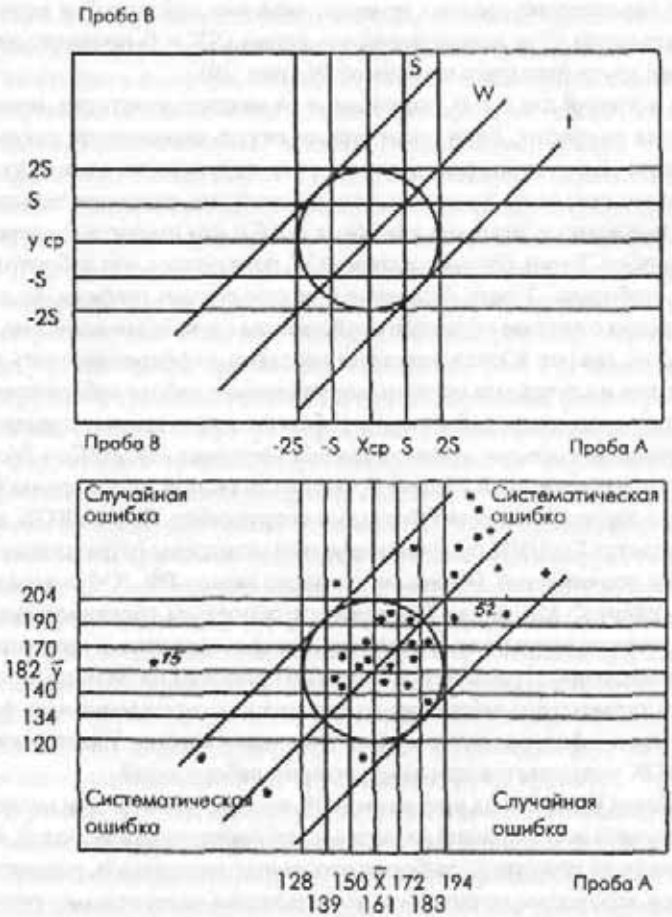


Рис. 20. Графика Юдена. По оси абсцисс - проба А - контрольная сыворотка А; по оси ординат - проба В - контрольная сыворотка В.
X - средняя арифметическая для пробы А; Y - средняя арифметическая для пробы В; XX' и YY' - две взаимно перпендикулярные прямые; S - среднеквадратичное отклонение; W - прямая, которую проводят под углом 450 через пересечение прямых XX' и YY'; S' и t - две касательные к окружности, проведенные параллельно прямой W. Точки, попавшие в верхний левый и нижний правый квадраты, указывают на случайные ошибки, а попавшие в верхний правый и левый квадраты - на систематические ошибки, допущенные лабораторией при исследовании контрольных проб.

45° через пересечение средних прямых, деля нижний левый и верхний правый квадраты. Две дополнительные линии (SX и t) проводят вдоль периферии круга параллельно прямой W. (рис. 20).

Пары значений для А и В, полученные от каждого участника, наносят в виде точек на график. Если точки попали внутрь окружности, результаты пригодны. Если точки располагаются вне окружности, но между параллельными прямыми, то значит, что лаборатории получили завышенные или заниженные значения для обеих проб и что имеются систематические ошибки. Точки, близкие к прямой W, показывают, что лаборатория работает стабильно. Точки, попавшие в другие секции графика, не дают представления о составе образца и свойственны случайным ошибкам. Таким образом, график Юдена позволяет наглядно дифференцировать систематические и случайные ошибки, допущенные в работе лабораторий, а также установить, какие лаборатории работают в допустимых пределах.

Федеральная система внешней оценки качества (ФСВОК) в России является государственной системой, осуществляемой по указанию Министерства здравоохранения РФ силами сотрудников Центра ВОК, входящего в состав ГосНИЦ профилактической медицины (учреждения федерального подчинения). Поскольку согласно закону РФ "Об охране здоровья населения" Минздрав РФ является основным государственным органом, ответственным за выработку правил оказания медицинской помощи населению страны, его приказы по организации ВОК носят обязательный характер для лабораторий медицинских учреждений всех форм собственности - федеральных, муниципальных, частных. Участие в программе ВОК учитывается при аккредитации лабораторий.

Разработка конкретных программ ВОК по отдельным видам исследований (перечень исследований аналитов, ритм проведения контролей, критерии оценки результатов), выбор контрольных материалов, рассмотрение итогов контрольных циклов осуществляется экспертными группами, в состав которых входят сотрудники Центра ВОК при ГосНИЦ профилактической медицины, Научно-методического центра по лабораторной диагностике при ММА им. И.М. Сеченова, ведущие специалисты профильных Центров и институтов МЗ РФ и РАМН, опытные заведующие крупных КДЛ.

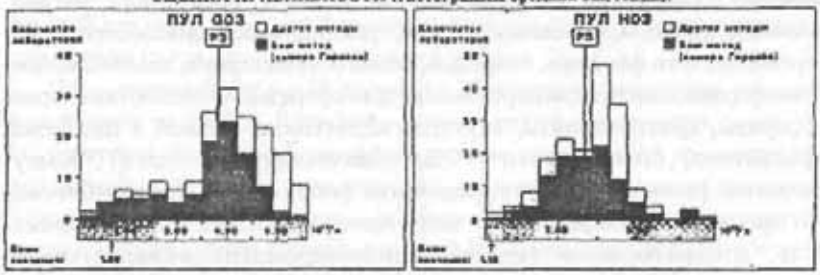
По данным В.Н.Малахова (1997), ФСВОК реализует 10 программ: "Гематология" (количественное определение концентрации гемоглобина и числа эритроцитов в крови) ; "Биохимия" (количественное определение в сыворотке крови концентрации альбумина, общего белка,

общего билирубина, глюкозы, железа, кальция, креатинина, магния, мочевой кислоты, мочевины, натрия, триглицеридов, бикарбонатов, неорганического фосфора, хлоридов, общего холестерина, аланинаминотрансферазы, амилазы, аспартатаминотрансферазы, гаммаглютамилтрансферазы, креатинкиназы, лактатдегидрогеназы, кислой и щелочной фосфатазы) ; "Анализ мочи" (19 биохимических показателей) ; "Коагулология" (количественное определение фибриногена, протромбинового времени, активированного частичного тромбопластинового времени) ; "Анализ гормонов" (количественное определение в сыворотке крови концентрации альдостерона, бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека, кортизола, лютеинизирующего гормона С-пептида, прогестерона, пролактина, свободных Т3 и Т4, тестостерона, тиреотропного гормона, тироксина, трийодтиронина, фоллитропина, эстрадиола, а также альфа-фетопротеина, раковоэмбрионального антигена, ферритина и теофиллина) ; "Микробиология" (правильность идентификации рода и вида микроорганизмов и определения их чувствительности к антибиотикам) ; "Гепатит В" (чувствительность и специфичность обнаружения поверхностного антигена вируса гепатита В); "Гепатит С" (чувствительность и специфичность обнаружения маркеров вируса гепатита С) ; "ВИЧ-инфекция" (чувствительность и специфичность обнаружения маркеров вируса ВИЧ-инфекции) ; "Цитология" (правильность и точность формулировки цитологического диагноза). Перспективные программы: "Фтизио-пульмонологические тесты"; "ПЦР-анализ маркеров вирусов гепатита, обнаружения возбудителей урогенитальных инфекций, определения групп крови".

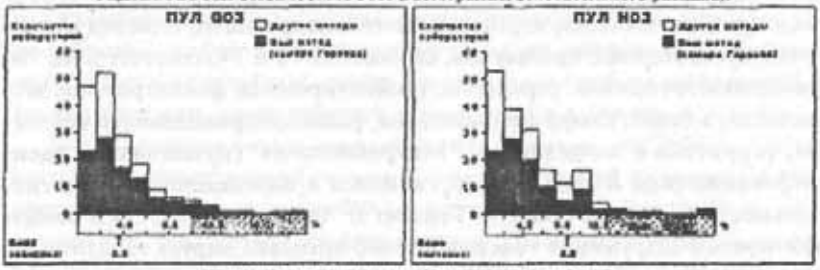
В рамках ФСВОК используются преимущественно коммерческие контрольные материалы производства отечественных и зарубежных фирм, отобранные экспертными группами на конкурсной основе по принципу наибольшего соответствия их свойств свойствам проб пациентов. В зависимости от особенностей отдельных программ рассылаются контрольные материалы различной формы (лиофилизированные, жидкие, микробиологические образцы, цитологические препараты), обычно и с нормальным, и с патологическим содержанием исследуемых компонентов. Ежегодно проводится от 2 до 3 циклов контрольных исследований. В соответствии с диапазоном проводимых в лаборатории видов исследований могут быть заказаны различные наборы контрольных материалов.

Для оценки количественных исследований из представленных лабораториями результатов рассчитывается среднее арифметическое значе-

ОЦЕНКА ПРАВИЛЬНОСТИ (гистограммы средних значений):



ОЦЕНКА ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ (гистограммы относительного размаха):



РЕЗУЛЬТАТЫ ВНЕШНЕЙ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА

Код пула	G03	H03
Ваше среднее значение, 10^{12}/л	1.69	1.16
Референтное значение (среднее по Вашему методу)	3.81	3.33
Ваше смещение, %	-55.6*	-50.2*
Диапазон допустимых значений (P3±1.64s)	2.64-4.97	1.78-2.90
Число лабораторий с Вашим методом	92	96
Коэффициент межлабораторной вариации, %	18.73	15.03
Среднее всех лабораторий, 10^{12}/л	4.03	2.43
Число всех лабораторий	162	166
Коэффициент межлабораторной вариации, %	20.11	15.31
Ваш относительный размах, %	3.55	8.62
Допустимый относительный размах, %	9.67	12.37
Средний относительный размах по Вашему методу, %	3.93	5.03
Средний относительный размах всех лабораторий, %	3.53	4.59

Рис. 21. Форма представления результатов внешней оценки качества исследований, выполненные в лаборатории, участвующей в ФСВОК (В.Н.Малахов, 1997)

ние двух повторных измерений (по степени близости среднего значения к референтному оценивается величина относительного смещения, систематическая погрешность) и относительный размах, т. е. разница между большим и меньшим значением в паре измерений (воспроизводимость, случайная погрешность), затем из ряда средних отбрасываются грубые выбросы (по 2,5% наименьших и наибольших значений). После того, как

осуществлена группировка лабораторий по используемым ими методам и проверка характера распределения результатов в группе (в случае необходимости распределение приводится к нормальному), рассчитанные результаты оценки правильности и воспроизводимости по сравнению с допустимыми отклонениями в графической и цифровой форме представляются каждой участвующей лаборатории (рис.21).

Оценка результатов полуколичественных методов исследования мочи *осуществляется путем сопоставления категории представленного нечислового результата с категорией*, к которой относится значение контрольного материала (нумерация категорий в направлении от отрицательного ответа к положительному, т. е. от (-) к (+++) ; от "реакция отсутствует" к "реакция сильно выраженная" и т. п.). При этом к первой категории относят контрольные материалы с нормальными значениями, с патологическими значениями – относят к разным категориям положительных ответов.

При оценке результатов, выражаемых набором числовых интервалов (0 - 0,1; 0,1 - 0,3 г/л и т.д.), значение общего среднего всех лабораторий сопоставляют с результатом отдельной лаборатории. Признается удовлетворительным полное совпадение интервала, а также совпадение с ближними третями соседних интервалов.

Результаты качественных методов оцениваются в зависимости от того, известен или нет порог обнаружения. Если неизвестен, то отрицательный результат должен характеризовать нормальное значение; если известен, то *при его превышении референтным значением (средним всех лабораторий)* правилен положительный результат, если референтное значение не превышает предел обнаружения, правилен отрицательный ответ. Оценка микробиологических результатов осуществляется относительно не средних результатов группы, а данных экспертных лабораторий – ГосНИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. А. А. Тарасовича и Государственного научного центра по антибиотикам МЗ РФ. Степень соответствия результата лаборатории-участника с экспертной оценкой выражается в баллах. При идентификации микроорганизмов: 2 балла – правильно до вида; 1 балл – правильно до рода; – 1 – неправильно; 0 – не проводилось. При определении чувствительности: 1 балл – правильно; 0 – неправильно или не проводилось определение. По итогам трех циклов за год рассчитываются индекс правильности идентификации:

$$в\,\% = \frac{I}{2N \times 100};$$

индекс правильности определения чувствительности

$$в\,\% = \frac{S}{n \times 100};$$

где I – сумма всех баллов лаборатории по идентификации,

N – число идентификаций,

S – сумма баллов за определение чувствительности,

n – число определений чувствительности.

Наименьшее допустимое значение индекса 85%.

Оценка результатов вирусологических исследований осуществляется по способности лаборатории дифференцировать пробы с уровнем антигена 1 нг/мл и выше как положительные.

Результаты цитологических исследований оцениваются путем сопоставления цитологического диагноза, установленного в лаборатории, с диагнозом группы независимых экспертов по 5 категориям: "правильный", "ложноположительный", "ложноотрицательный", "неполный/неточный", "не установлен".

В последующем ФСВОК будет развиваться путем создания сети региональных центров. Это расширит возможность включения большей части лабораторий в единую общероссийскую систему внешней оценки качества лабораторных исследований.

Создание таких региональных центров облегчается сложившимся в ряде территорий опытом межлабораторного контроля качества, который проводится местными организационно-методическими и контрольными центрами под руководством главных специалистов по лабораторной диагностике органов управления здравоохранением регионов.

Аккредитация лучших лабораторий в качестве экспертных (аналог референтных) также укрепит методическую основу ФСВОК. В ближайшее время должны быть разработаны "Правила проведения внешней оценки качества лабораторных исследований" и нормы точности для ВОК, подобно тому, как это было сделано в отношении системы внутрилабораторного контроля качества.

Альтернативные системы ВОК. Наряду с государственной ФСВОК лаборатории имеют возможность участвовать в других программах ВОК в качестве дополнительной меры контроля качества, в частности, по тем видам исследований, которые не представлены в программах ФСВОК. Среди них можно назвать международную независимую систему ВКК (внешний контроль качества), охватывающую ряд лабораторий России, Украины, Латвии,

а также Чехии и Австрии. Контрольные материалы - на основе сыворотки человека, клинико-химического характера (А.В.Мошкин, 1997)).

Значительным опытом располагает финская некоммерческая организация Labquality, которая предлагает свыше 250 контрольных программ практически по всем разделам лабораторной медицины. Среди 26 стран, в которых она имеет своих клиентов, и Россия (Annual Rewiew, 1997).

Ряд фирм предлагают российским лабораториям участие в своих коммерческих программах (МП "Агат", Randox, Bio-Rad и др.).

В отличие от внутрилабораторного контроля ВОК не оказывает прямого сиюминутного влияния на качество лабораторных результатов, и поэтому участие в программах внешней оценки качества не может заменить собой повседневное проведение внутрилабораторного контроля качества. Тем не менее, оценка результатов, полученная от системы ВОК, является стимулом для улучшения работы лаборатории. Если ошибка постоянно регистрируется, а причина погрешности не ясна, используют следующий алгоритм действия:

1. Информация об отклонении результата по данным ВОК
2. Проверка состояния аппаратуры, реактивов, калибраторов; пересмотр результатов внутрилабораторного контроля
3. Повторное исследование (запросить повторно контрольный образец)
4. Проверить наличие аналогичных отклонений на пробах пациентов
5. Проверить правильность выполнения всех деталей аналитической процедуры
6. Изменить применяемый метод исследования

Таким образом, при всех отличиях двух форм контроля, между ними существует тесная связь. Некоторые фирмы (например, Bio-Rad), предлагая свои программы ВОК, рекомендуют использовать те же контрольные материалы для повседневного контроля. Лаборатории, систематически участвующие в экспериментах по контролю качества исследований, могут использовать результаты контроля для оценки качества своей работы. Особенно ценными являются долгосрочные контрольные опыты. Обе формы контроля качества можно рассматривать в рамках единого цикла совершенствования аналитики (Uldall, 1996) (рис. 22).

По данным систем внешней оценки качества исследований в различных странах доля ошибочных результатов колеблется от 0, 8 до 4, 1 %. Рассматривая качество как отношение количества допущенных ошибок к их возможному количеству, Goldschmidt (1999) расценил реальный средний уровень качества лабораторной работы как 2%, т.е. 1 ошибка на 50 исследований.

Рис. 22. Цикл совершенствования качества аналитики.

Обеспечение и оценка качества лабораторных исследований на постаналитическом этапе

Оценку качества результатов проведенных в лаборатории исследований на постаналитическом этапе можно разделить на две фазы : лабораторную и клиническую.

Успех проводимой на этом этапе работы зависит от тесного взаимодействия работников лаборатории и клиницистов.

Dharan (1977) предлагал основное внимание на постаналитическом этапе обращать на правильность расчетов результатов и перевода единиц измерения, на характер калибровочной кривой, на данные контрольных карт, на качество занесения результатов на бланки выполненных анализов. Эти акценты соответствуют оснащению лабораторий, рассчитанному на ручное выполнение исследований, расчетов и заполнение бланков анализов. При выполнении исследований на автоматическом оборудовании возможность подобных дефектов снижается, поскольку ошибки, вызванные человеческой невнимательностью или небрежностью, исключаются или сводятся до минимума. На первый план выходит проверка соответствия полученных результатов клиническим задачам. Одним из наиболее важных критериев качества лабораторных исследований служит доля неправильных результатов лабораторных тестов, которые оказали неблагоприятное влияние на лечебную деятельность. В

таблице 35 приведены данные нескольких наблюдений, характеризующих клиническую значимость лабораторных ошибок.

Отражая эту озабоченность, Buttner (1994) предложил в схеме оценки лабораторных результатов наряду с их оценкой на техническом уровне (собственно аналитика) и биологическом уровне (использование данных о биологической вариации, сравнение с референтными величинами, с предыдущими результатами у того же пациента и т.д.) выделить и нозологический уровень, который включает первичную интерпретацию результатов с учетом патобиологических данных, связи с определенной патологией, дифференциально-диагностических программ (Рис. 23).

Поскольку с клинической точки зрения лабораторной ошибкой является результат исследования, не соответствующий клинической картине, H.Goldschmidt (1999) также рекомендует, чтобы лабораторный результат сообщался в клинику с его интерпретацией. Представляется важным, чтобы работники лабораторий постоянно обменивались информацией с лечащими врачами относительно клинического эффекта проводимых ими лабораторных тестов как применительно к отдельным пациентам, так и к нозологическим формам. В таком общении более быстро формируется как индивидуальный объем знаний, так и коллективный опыт рационального клинического применения все возрастающего арсенала лабораторных тестов (рис. 24). Участие в интерпретации лабораторных результатов в качестве одной из обязанностей врача клинической лабораторной диагностики предусмотрено положением об этой категории лабораторных специалистов, утвержденным Приказом Минздрава РФ № 380 от 25 декабря 1997г. (В функции биолога клинико-диагностической лаборатории интерпретация результатов лабораторных анализов не входит).

Таблица 35

Лабораторные ошибки и их последствия для больных

Авторы наблюдений	*Число пациентов*	*Влияние на клин. меры (%)*	*Риск неоправданных мер (%)*
J.W.Ross, D.J.Boone (1991)	336	30	7
A.Nutting et al. (1996)	180	27	12
M.Plebani, P.Carraro (1997)	189	26	6,4

В пост-пост-аналитической фазе обеспечения и оценки качества лабораторных исследований основная роль принадлежит клиницистам, которые, располагая всем объемом информации о пациенте, принимают окончательное решение о клинической приемлемости лабораторных результатов. На основе обобщения применения различных лабораторных тестов при определенных формах патологии может осуществляться т.наз. "клинический аудит", то-есть оценка клиницистами ценности применяемых лабораторией тестов и используемых при этом методов, а также степени соответствия аналитической и клинической точности лабораторных исследований. Не следует рассматривать эту форму влияния клиницистов на лабораторную сферу как ущемляющую самостоятельность результаты

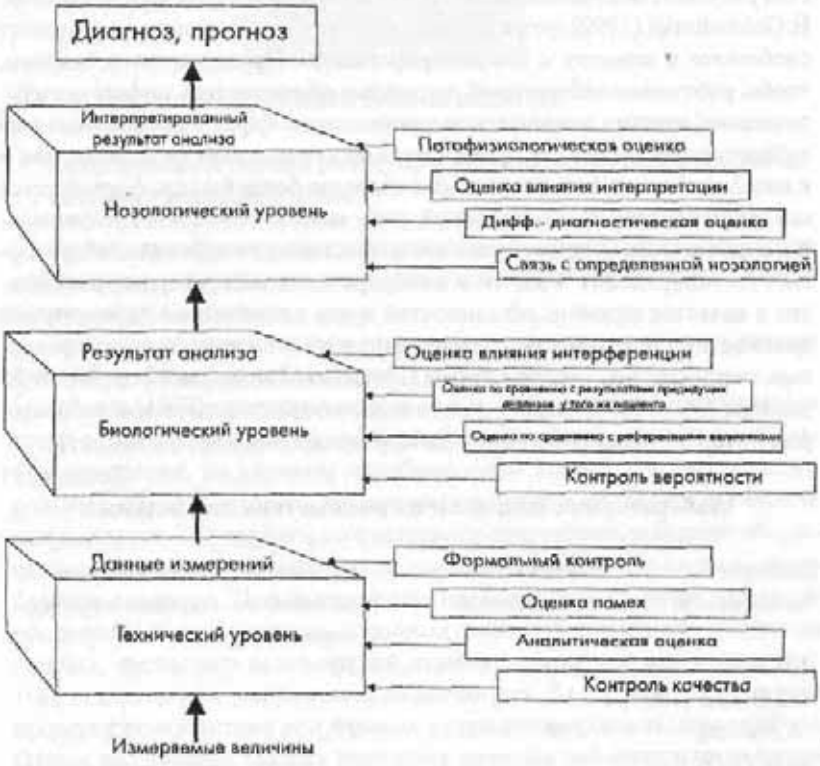


Рис. 23. Многоуровневая оценка результатов лабораторных исследований (по Buttner, 1994).

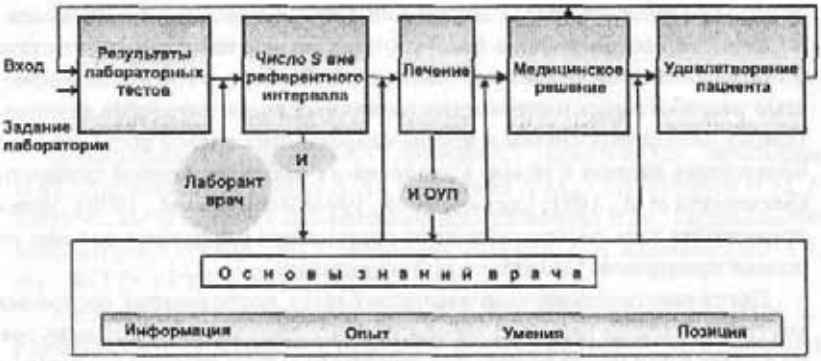


Рис. 24. Модель формирования знаний в области клинической лабораторной диагностики (по Wtggeman, 1997; Golfsschmidt, 1999).

клинической лаборатории, поскольку лаборатория, выполняя заказы клиницистов на выполнение исследований, должна быть заинтересована в полезности своего труда, последнее слово в оценке которой принадлежит именно клиницисту. Со своей стороны лабораторные специалисты должны активно сотрудничать с клиницистами, участвуя в клинических конференциях, в разборах случаев заболеваний, пропагандируя разработанные лабораторной медициной подходы к оценке диагностической чувствительности, специфичности и предсказательной ценности лабораторных тестов.

В последнее время наряду с концепцией "хорошей лабораторной работы", нацеленной главным образом на внутрилабораторную сферу, Haeckel et al. (1998) было выдвинуто понятие "хорошей медицинской лабораторной службы", которое предусматривает" обеспечение лабораторией доставки правильной лабораторной информации в нужное время нуждающемуся в ней работнику за справедливую цену". Важными компонентами этой концепции является наличие хорошей связи лаборатории и клиники, что предусматривает в начале" правильную постановку задачи перед лабораторией и правильную доставку правильно собранной пробы биоматериала", а в завершение - "правильные выводы из предоставленной лабораторией информации".

При интерпретации результатов исследований следует учитывать проводимую пациенту лекарственную терапию. Поскольку литература по лекарственной интерференции весьма обширна, рационально использовать компьютерные базы данных о влиянии лекарственных средств на

результаты лабораторных исследований. Перспективным средством оценки качества исследований в пост-пост-аналитической фазе может стать мультивариантный анализ полученных результатов, в том числе с помощью разработанных в отношении различных видов патологии компьютерных экспертных систем и других современных систем обработки лабораторных данных с целью выявления их информационной ценности (Saranummi et al., 1991; Lucasius et al., 1994; Barnhill et al., 1998). Успех применения этих систем зависит от составления баз данных для них на основе принципов "доказательной медицины".

Постаналитический этап завершает цикл исследования состояния внутренней среды пациента лабораторными средствами, и достигнутые на основе этого цикла результаты лечения больного являются конечным мерилом качества лабораторной работы как одной из важных составляющих качества медицинской помощи пациенту в целом. Поэтому обратная связь на основе обобщения сведений об информационной ценности и клинической полезности как вообще лабораторных данных, так и отдельных тестов применительно к конкретным формам патологии и клиническим ситуациям (рис. 25), является важнейшим необходимым условием эффективности управления качеством лабораторных исследований.

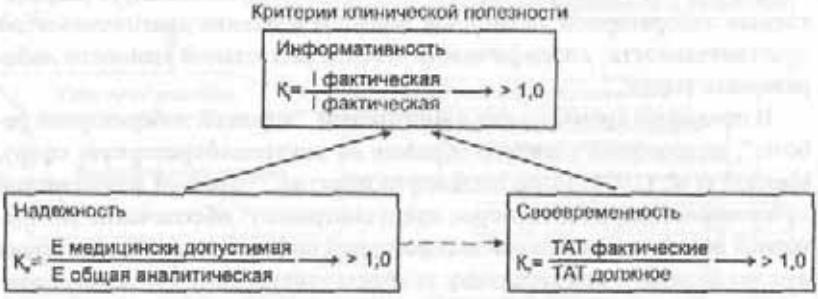


Рис. 25. Критерии клинической полезности лабораторных данных: I - информативность; Е - ошибка; ТАТ - время оборота "клиника - лаборатория - клиника", т.е. срок от назначения анализа врачом и взятия образца биоматериала до получения врачом лабораторного результата.

Литература

Войхонский В.Л., Алипов А.Н., Бойцов А.Г., Егорова О.В., Запольская Н.М., Литовка О.Н., Порин А.А., Муравник Л.М., Сафьянников Н.М. // Техническое оснащение лабораторных исследований// В кн.: Медицинские лабораторные технологии. Справочник. Под ред. А.И. Карпищенко// Т.1, стр. 30-125.// СПБ., Интермедика. 1998.

Andresen B.D., Hurtuk B.W, Ng K.J.// Mass Spectrometry// In: Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.).// W.B.Saunders Company // Philadelphia.// 1987. // pp.137-143.

Buffone G.J.// Principles of immunochemical techniques.// In: Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.).// W.B.Saunders Company // Philadelphia.// 1987. // pp.144-159.

Burtis C.A., Bowers L.D., Chattoraj S.c., Ullman M.D.// Chromatography.// In: Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.).// W.B.Saunders Company // Philadelphia.// 1987. //pp.105-123.

Caraway W.T.// Photometry// In: Fundamentŷals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.).// W.B.Saunders Company// Philadelphia.// 1987.// pp. 46-65.

Coulter W.H.// In : Proc. Natl. Elect. Conf.// 1956, 12 : 1034 - 1040.

Dillman L.T. Radionuclide decay schemes and nucclear parametersfor use in radiation-dose estimation.// J. Nucl. Med. , Suppl. 2, 1969.

Ekins R.P.// Clin. Chem.// Ligand assays : from electrophoresis to miniaturized microarrays.// 1998. v. 44, PP. 2015-2030.

Epstein E.// Electophoresis.// In: Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.).// W.B.Saunders Company// Philadelphia.// 1987.// pp. 77-86.

Farrant J., Lane A.// The value of measuring intracellular cytokines by flow cytometry.// Europ. Clin. Lab. 1999.// v.18, 2, p.12.

Hanson C.A.// Peripheral Blood and Bone Marrow: Morphology, Counts and Differentials, and Reactive Disorders.// In: Clinical Laboratory Medicine. K.D McClatchey (ed.)// Williams & Wilkins.// Baltimore.// 1994. pp. 817-1044.

J. Hemmila// LanSthanides as probes for time-resolved fluorometric immunoassays.//Scand. J. Clin. Lab. Invest.// 1988, 48: 389-400.

Moss D.W., , Henderson A.R., , Kachmar J.E.// Enzymes// In: Textbook of Clinical Chemistry. N.W. Tietz (ed.)//W.B. Saunders Company.// Philadelphia.// 1986. pp 619- 699.

Powsner E.R.// In: Fudamentals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.).// W.B.Saunders Company// Philadelphia.// 1987. // pp. 124-137.

Siggard-Andersen O.// Electrochemistry// In: Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W.Tietz (ed.).// W.B.Saunders Company// Philadelphia.// 1987./ / pp. 87-100

O. Suovaniemi.// The vertical measerment principle in photometry.// Int. Biotechn.labor.// May-June, 1984.

СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ АНАЛИТИКЕ

Статистические методы широко используются во всех областях научной и практической деятельности, их применение каждый раз имеет свои особенности, которые определяются задачами и характером обрабатываемого материала. В клинической лабораторной диагностике статистические методы обработки материала используются для :

- контроля качества выполняемых исследований,
- оценки достоверности и сопоставимости используемых методов,
- калибровки,
- разработки норм (референтных или справочных значений).

Особенность статистической обработки любого клинического материала, в том числе и лабораторного, в том, что никакой случай не может быть отброшен, поскольку каждый раз это данные реального пациента. Если в экспериментальной работе исследователь может себе позволить повторить некоторые опыты, которые с его точки зрения получились неудачными, то в клинической практике это невозможно.

Другое существенное отличие - это массовость материала. Экспериментальная или клиническая научная работа обычно оперирует двумя-тремя десятками случаев, а часто и меньшим их числом, что требует использования специальных методов обсчета так называемых «малых выборок». В то же время 30-40 анализов – это один день работы маленькой клинической лаборатории, в больших же лабораториях без всякого усилия собирается материал, измеряемый тысячами случаев.

Третья особенность состоит в том, что распределение результатов клинико-лабораторных данных чаще всего не является нормальным, в том смысле, что не описывается Гауссовой кривой распределения.

Ниже описываются те понятия и численные методы обработки данных, с которыми чаще всего приходится сталкиваться специалистам кли-

нической лабораторной диагностики, при этом существо вопросов, для решения которых используются вычисления, не обсуждается. Отдельные примеры надо рассматривать лишь как иллюстрации к методам, а не как рекомендации по сути вопроса.

Любая совокупность или множество однородных данных например, результаты измерений или данные лабораторных анализов, определенным образом распределены в том смысле, что какие-то результаты получаются чаще, чем другие и, соответственно, в большем числе присутствуют в накопленном материале. Кривая, которая на рисунке изображает это распределение, называется гистограммой. Практически лабораторная диагностика имеет дело не с кривыми, а с наборами точек или столбиков, т.е. с дискретными данными. Так как все лабораторные исследования выполняются с определенной точностью, эта точность и есть ширина столбика или расстояние между точками на рисунке. В ряде случаев, главным образом когда данных мало, несколько результатов, имеющих близкие значения, например 10,4 и 10,5, объединяют в один класс (или группу) и изображают на рисунке одной точкой или столбиком.

Среди огромного числа возможных видов распределений особое место занимает так называемое нормальное или Гауссово, гистограмма которого симметрична и имеет колоколообразную форму. Это означает, что чем больше данный результат отклоняется от средней величины, тем он менее вероятен. Данные многих измерений: рост людей, размеры деталей, изготовляемых на автоматических станках и др. подчиняются этому закону. К сожалению, лабораторные показатели составляют исключение: распределение результатов лабораторных анализов для группы пациентов, отражающее биологическую особенность - межиндивидуальный разброс, обычно асимметрично и не является нормальным, что осложняет обработку лабораторных данных. Однако, случайные погрешности (ошибки) измерений, связанные именно с аналитическим процессом, как правило, распределяются нормально.

В научных исследованиях, когда в силу необходимости приходится оперировать ограниченным числом наблюдений, часто нет возможности проверить характер распределения, его молча принимают за нормальное и проводят статистическую обработку по правилам и критериям, разработанными для этого случая. Это не вполне корректное допущение, которое может стать причиной неправильного вывода. В повседневной работе врача-лаборанта материал практически неограничен, поэтому перед статистической обработкой следует проверить характер распределе-

ния, например, используя описанный ниже метод хи-квадрат (χ^2), и лишь в том случае, если окажется что распределение нормальное, использовать разработанные для нормального распределения методы статистической обработки.

1. Дисперсия.

Любое распределение, независимо от того, является ли оно нормальным или нет, характеризуется следующими параметрами (см. рис. 1):

- средней арифметической (центральной) величиной, которую получают сложив все результаты и разделив сумму на число случаев,
- модой - величиной которая чаще всего встречается,
- медианой - величиной которая делит все множество на две равные части, число результатов, которые меньше (на рисунке левее) и которые больше (на рисунке правее) медианы, одинаково,
- дисперсией - суммой квадратов различий между каждым результатом и средней величиной, деленной на число наблюдений.

Каждый единичный результат часто обозначают символом Xn с индексом, который указывает порядковый номер данного результата или измерения.

Рис.1. Гистограмма распределения 3788 результатов определений общего билирубина.

Среднюю величину обозначают латинской буквой M или $\bar{X}$,а также X_{cp}, число случаев латинским **n**, а суммирование результатов греческой буквой Σ «сигма заглавная» с индексом:

$$X_{cp} \frac{\sum_{n} X_n}{n}$$

индекс n означает, что суммированы n величин X_1, X_2 .... X_n, В тех случаях, когда очевидно, о суммировании каких величин идет речь, этот индекс не пишут. Дисперсию вычисляют по формуле:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{n} (x_n - x_{cp})^2}{n}$$

Она характеризует разброс результатов, т.е. насколько кучно они лежат около средней или центральной величины. Дисперсию обычно обозначают греческой буквой σ^2 (строчная сигма в квадрате). Не надо путать дисперсию и среднее квадратичное отклонение (s), которое есть корень квадратный из дисперсии:

$$s = \sqrt{\sigma^2}$$

Надо подчеркнуть, что дисперсия может быть рассчитана для любого множества, независимо от того, подчиняется оно закону нормального распределения или нет, и во всех случаях она обладает рядом важных свойств, о которых речь пойдет ниже. Однако, если распределение Гауссово, то корень квадратный из дисперсии, т.е. среднее квадратичное отклонение, обладает рядом дополнительных свойств. Часто оперируют не средней величиной и дисперсией, а их оценками, об этом подробнее пойдет речь в разделе о нормальном распределении, .

Среднее арифметическое и дисперсию несложно подсчитать вручную непосредственно по приведенным формулам. Однако, в компьютерный век это обычно делает компьютер за «один проход». Для этого вычисляют сумму величин Σx и сумму их квадратов Σx^2 , среднее арифметическое и среднее квадратичное отклонение рассчитывают по формулам:

$$X_{cp} = \frac{\Sigma x}{n}; \sigma^2 = \frac{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2 / n}{n}$$

Их вывод несложен. Сумму квадратов различий между индивидуальными значениями и средней можно представить в следующем виде:

$$\sum (X_n - X_{cp})^2 = \sum\left(X_n^2 - 2X_{cp}X_n + X_{cp}^2\right) =$$
$$= \sum X_n^2 - 2X_{cp}\sum X_n + nX_{cp}^2$$

Подменяя X_{cp} на его значение $\Sigma X_n / n$ и деля на число случаев n получаем:

$$\sigma^2 = \sum\left(X_n - X_{cp}\right)^2 / n = \left(\sum X_n^2 - \left(\sum X_n\right)^2 / n\right) / n$$

Когда множество состоит из подмножеств (или групп) общая дисперсия есть сумма дисперсией подмножеств. Рассмотрим это на примере индивидуальных и межиндивидуальных вариаций. Допустим что у группы людей ежедневно на протяжении определенного времени определяли концентрацию гемоглобина в крови. Естественно, что день на день не приходится и результаты анализов у одного и того же человека в разные дни могут несколько различаться. Это будут внутрииндивидуальные колебания, которые характеризуются внутрииндивидуальной дисперсией $\sigma^2_{инд}$, обычно они составляют около 5 г в литре. Однако, различия между разными людьми, так называемые межиндивидуальные, которые характеризуются $\sigma^2_{меж}$, значительно больше. Оказывается, что общая дисперсия $\sigma^2_{общ}$ будет равна сумме дисперсии внутрииндивидуальной и межиндивидуальной. Это положение справедливо по отношению к любому множеству данных, независимо от характера распределения, доказать его не сложно. Пусть имеется серия измерений, которую мы запишем в виде таблицы, причем каждая строка таблицы - это данные одного и того же пациента, которому сделано **m** анализов. Среднее данного пациента - среднее всей серии измерений (общее среднее) $X_{сробщ} = \sum_n X_{срn} / n$

пациент 1. $X_{11}\ X_{21}\ X_{31}$ ..... X_{m1}; $X_{ср1} = \sum_m X_{m1} / m$

пациент 2. $X_{12}\ X_{22}\ X_{32}$ ..... X_{m2}; $X2 = \sum_m X_{m2} / m$

пациент 3. $X_{13}\ X_{23}\ X_{33}$ ..... X_{m3}; $X_{ср3} = \sum_m X_{m3} / m$

. . . . . .

пациент n $X_{1n}\ X_{2n}\ X_{3n}$ ..... Xmn; $X_{срn} = \sum_m X_{mn} / m$

Первый индекс означает порядковый номер анализа данного лица, второй индекс - порядковый номер пациента.

Очевидно, что для каждого конкретного анализа справедливо выражение:

$$X_{mn} - X_{сробщ} = (X_{mn} - X_{срn}) + (X_{срn} - X_{сробщ})$$

т.е. что различие между каждым индивидуальным результатом и общей средней равно сумме разностей между результатом конкретного анализа и средней данного пациента и различия между средней данного пациента и общей средней.

Возведя правую и левую части этого выражения в квадрат и суммируя, получаем:

$$\sum (X_{срn} - X_{общср})^2 = \sum (X_{mn} - X_{срn})^2 +$$

$$+ 2\sum_{m,n} ((X_{mn} - X_{срn})(X_{срn} - X_{общср})) + m\sum (X_{срn} - X_{общср})^2$$

Первый и последний члены всегда положительны, поскольку это суммы квадратов чисел, а вот средний член равен нулю, так как это сумма взаимоуничтожающихся положительных и отрицательных величин. Разделив обе части на общее число случаев (mn), получаем то, что требовалось доказать:

$$\sigma^2_{общ} = \sigma^2_{инд} + \sigma^2_{меж}$$

Надо подчеркнуть, что в данном случае $\sigma^2_{инд}$ есть средняя величина всех квадратов различий между каждым индивидуальным значением и средней данного пациента, а $\sigma^2_{меж}$ есть дисперсия средних величин пациентов относительно общей средней величины.

Если какая-либо величина является результатом сложения или вычитания двух независимых измерений, например, глобулины ($Г_n$) пациента с порядковым номером n есть разность между содержанием у него общего белка ($Б_n$) и альбумина ($А_n$), то дисперсия расчетной величины всегда равна сумме дисперсий исходных значений, независимо от того, получена расчетная величина путем сложения или вычитания. Рассмотрим это на примере глобулина:

$$Г_n = Б_n - А_n; \quad \sum Г_n = \sum Б_n - \sum А_n \quad Г_{ср} = Б_{ср} - А_{ср};$$

Для каждого конкретного анализа с порядковым номером **n** справедливо выражение:

$$Г_n - Г_{ср} = (Б_n - Б_{ср}) - (А_n - А_{ср})$$

После возведения в квадрат и суммирования получаем значение дисперсии результатов определения глобулина:

$$\sum(Г_n - Г_{ср})^2 = \sum((Б_n - Б_{ср}) - (А_n - А_{ср}))^2 =$$
$$= \sum(Б_n - Б_{ср})^2 - 2\sum(Б_n - Б_{ср})(А_n - А_{ср}) + \sum(А_n - А_{ср})^2$$

если, как и в предыдущем примере, концентрации белка и альбумина независимы друг от друга, то

$$\Sigma(Б_n - Б_{ср})(А_n - А_{ср}) = 0$$

равно нулю, так как это сумма одинакового количества положительных и отрицательных членов, поэтому

$$\sigma_г^2 = \sigma_б^2 + \sigma_а^2$$

Если же исходные величины как-то связаны между собой, например, если пациенты с гипопротеинемией одновременно страдают и гипоальбуминемией, описанная закономерность не будет иметь места и дисперсия расчетного показателя будет меньше суммы исходных дисперсий.

Таким образом, дисперсия расчетного показателя, вычисленного как сумма или разность нескольких независимых величин, всегда равна сумме исходных дисперсий, независимо от того, при расчете складываются эти величины или вычитаются. Если же для вычисления используется какая-либо более сложная формула, чем простое сложение и вычитание — например при расчете глобулин-альбуминового коэффициента или цветного показателя, зависимость оказывается более сложной, но ее направленность не меняется. Надо подчеркнуть, что речь идет именно о дисперсии (σ^2), т.е. квадрате различий, а не о среднем квадратичном отклонении (σ), которое есть корень квадратный из дисперсии.

Описанные закономерности можно использовать в практической работе лабораторий для анализа аналитических погрешностей. При этом исходят из предположения, которое нельзя строго доказать, но которое представляется очень вероятным, что суммарная ошибка определения складывается из трех компонент:

- погрешности отмеривания (пипетирования) исследуемого биологического материала,

- погрешности фотометрии и
- погрешности самой химической реакции:

$$\text{общая погрешность анализа} = \text{погрешность отмеривания} + \text{погрешность фотометрии} + \text{погрешность химической реакции}$$

Погрешность фотометрирования можно уменьшить, выбрав другой диапазон измеряемых величин, погрешность отмеривания - используя другой дозатор, а характер течения химической реакции зависит от всех условий выполнения анализа. Поэтому если дисперсия результатов биохимического исследования превышает величину, которую лаборатория считает допустимой, важно уметь найти слабое звено. Ниже описывается эксперимент, который позволяет оценить погрешности отмеривания и фотометрии при использовании фотометра FP-900.

В 9 кювет одного блока кювет фотометра было внесено по 700 мкл воды и по 10 мкл 2% раствора бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$). Получились растворы слабо желтого цвета, которые при фотометрии со светофильтром 3 (длина волны 450 нм) имели оптическую плотность около 0.4. Их фотометрировали 9 раз, каждый раз процедура выполнялось заново, т.е. устанавливался светофильтр и измерялась холостая проба. Поэтому измерения можно считать независимыми, их результаты, выраженные в тысячных долях единицы оптической плотности, приведены в таблице 1. Каждая ее строка - это данные повторного измерения одной и той же пробы (как бы индивидуальные колебания), которые характеризуют точность фотометрии, *различия между средними* строк - это межиндивидуальные различия, характеризующие точность отмеривания.

Как видно, величины дисперсий внутри каждой строки заметно различаются между собой, что не удивительно, поскольку это случайные величины. Однако, суммарная «внутрииндивидуальная» дисперсия (по существу средняя дисперсий внутри строк) невелика - 13,6 тысячных единицы оптической плотности, что соответствует среднему квадратичному отклонению 3,69 и коэффициенту вариации 0,84%. Поэтому точность самой фотометрии можно считать удовлетворительной. Точность же отмеривания, т.е. дисперсия между рядами значительно ниже — 162,3, что соответствует средней квадратичной 12,7 или коэффициенту вариации 2,89%. В данном примере теоретические положения хорошо реализовались: «внутрииндивидуальная» *дисперсия 13,6*, между средними

Таблица 1

Многократные измерения оптических плотностей разведенного раствора $K_2Cr_2O_7$ (10 мкл 2% раствора пипетировали в 700 мкл воды, длина волны 450 нм)

оптическая плотность х 1000									$X_{ср}$	σ^2	s	v%
413	414	420	422	432	420	421	421	420	420,3	26,0	5,10	1,21
427	427	429	429	429	428	428	428	427	428,0	0,7	0,82	0,19
428	434	443	442	441	439	439	438	438	438,0	18,7	4,32	0,99
434	433	435	436	435	437	436	436	430	435,3	1,3	1,15	0,27
430	432	433	439	444	439	440	440	440	437,4	19,1	4,37	1,00
429	426	437	437	436	434	434	433	433	433,2	12,0	3,46	0,80
460	461	466	467	464	454	454	454	453	459,2	28,2	5,31	1,16
449	452	455	456	455	447	447	446	448	450,6	14,0	14,0	0,83
457	457	462	461	460	460	459	459	458	459,2	2,6	2,6	0,35
$X_{ср}$												
436,3	437,3	442,2	443,2	444,0	439,8	439,8	439,4	439,2	общие для всего массива			
σ^2												
216,4	222,2	217,1	200,8	144,4	137,3	129,3	129,4	132,2	440,1	175,8	13,26	3,01
S												
14,71	14,71	19,91	14,73	14,17	12,02	11,72	11,37	11,50				
v%												
3,37	3,41	3,33	3,20	2,71	2,66	2,59	2,59	2,62				

строк 162,1, общая - 175,8 практически равна их сумме 162,1 + 13,6 = 175,7. Таким образом, в условиях нашего эксперимента основным источником ошибок является отмеривание. Чтобы его уменьшить, надо изменить методику - использовать более точную пипетку или работать в том диапазоне, где точность отмеривания данной пипеткой больше - допустим, брать 50 мкл, а не 10 мкл..

Этот пример показывает также, что со средним квадратичным отклонением и коэффициентом вариации надо обращаться с осторожностью: коэффициент вариации фотометрии 0,84%, отмеривания 2,89%, а суммарная точность измерения меньше их суммы и характеризуется коэффициентом вариации 3,01%. Эта величина соизмерима с требованиями к точности ряда биохимических клинико-диагностических исследований (приказ МЗ РФ № 45 от 7.02.2000).

Зная дисперсию (погрешность) фотометрии, выраженную в единицах оптической плотности, нетрудно вычислить и связанную с ней погрешность окончательных результатов, выраженную в г/л или ммоль/л. Для этого надо погрешность фотометрии умножить на фактор, полученный при калибровке (угол наклона калибровочного графика). Так, если, как в нашем

примере, погрешность фотометрии характеризуется средним квадратичным отклонением 3,69 тысячных единицы оптической плотности, то разброс результатов анализов по причине неточности фотометрии будет характеризоваться приведенными в таблице 2 средними квадратичными отклонениями, выраженными в единицах концентраций. (факторы пересчета взяты из практической работы и носят ориентировочный характер).

Погрешность, связанная с неточностью отмеривания, разумеется еще выше, она может быть оценена аналогичным образом.

Формула для вычисления суммарной погрешности может использоваться и при выборе оптимального варианта микрометода. Поскольку реактивы дороги, их экономят, пропорционально уменьшая размер пробы, в результате приходится пипетировать очень небольшие количества сыворотки, например 5 мкл. Ручным дозатором трудно сделать это точно, поэтому иногда сначала разводят сыворотку в 10 раз, а затем берут для исследования 50 мкл разведенного материала. Иными словами, вместо того, чтобы один раз пипетировать 5 мкл, пипетируют 3 раза — сначала 450 мкл воды, в нее вносят 50 мкл сыворотки и в третий раз отбирают 50 мкл разведенной сыворотки.

Чтобы проверить, насколько такой прием эффективен, следует поставить эксперимент, аналогичный описанному ниже (см. таблица 3), в котором оценивается воспроизводимость пипетирований по 5, 50 и 450 мкл. Для чего в одинаковые объемы воды пипетировали растворы бихромата калия разной концентрации, подобранные так, чтобы окончательные концентрации (и, соответственно величины оптических плотностей) были одинаковы. Для простоты расчетов результаты фотометрии выражены в тысячных долях единицы оптической плотности.

В этом эксперименте дисперсия, характеризующая воспроизводимость пипетирования 5 мкл, оказалась 129.3, что меньше, чем в предыдущем примере, где пипетирование 10 мкл проводилось с дисперсией 162.1. Однако надо учитывать и абсолютные величины — в первом примере средняя ОП была 440, а во втором почти в два раза меньше — 230, поэтому дисперсия относительно средней величины при уменьшении отмериваемого объема фактически увеличилась.

Суммарная величина дисперсий трех пипетирований — два раза по 50 мкл и один раз 450 мкл - составляет 29,6+29,6+5,6=64,8, что значительно меньше, чем дисперсия одного пипетирования 5 мкл — 129,3. Этот расчет показывает, что можно повысить точность измерения объема, если вместо того, чтобы сразу отмерить 5 мкл, сначала развести ра-

Таблица 2

Погрешности фотометрии и обусловленные ими аналитические погрешности в зависимости от факторов пересчета (углов наклона калибровки).

Название анализа и размерность	Средняя квадратичная погрешность в абсолютных величинах			
	диапазон нормы	фактор пересчета	по вине фотометра	допустимая
Альбумина г/л	35-55	307	1,1	2
Общий белок г/л	65-85	529	1,9	3,35
Билирубин общий, мкмоль/л	1-20	164	0,6	3,4
Кальций, ммоль/л	2.02-2,65	4,4	0,017	0,085
Мочевая кислота, мкмоль/л	140-420	9198	34	33
Холестерин, ммоль/л	3,9-6,7	13	0,05	0,45
Триглицериды ммоль/л	1,11-2,82	6,63	0,02	0,34
Железо сывороточное, мкмоль/л	7-28	808	3	1,2
Амилаза, мг/л/час	12-30	251	0,9	4,8

Таблица 3

Статистическая обработка воспроизводимости измерений объемов

Пипетируемый объем	5 мкл	50 мкл	450 мкл
Концентрация исходного раствора бихромата калия	2%	0,2%	0,022%
Число измерений (n)	17	18	16
Средняя величина оптической плотности х 1000	230,9	220,4	225,9
Дисперсия (σ^2)	129,3	29,6	5,6
Среднее квадратичное отклонение (s)	11, 1	5,4	2,3
Коэффициент вариации %% (v%)	4,8	2,45	1,01

створ в 10 раз (взять 50 мкл раствора и 450 мкл воды), а затем отмерить 50 мкл разведения. В данном случае замена одного пипетирования тремя достоверно оправдана, хотя первое впечатление, основанное на сравнении коэффициентов вариации или средних квадратичных, обратное.

Вычисление дисперсии может сослужить определенную пользу и при работе с расчетными показателями, например, если надо оценить разброс результатов определения глобулинов расчетным методом по разности между общим белком и альбумином. В таблице 4 приведены данные 98 пациентов обследованных на протяжении одного рабочего дня. В данном случае речь идет не о точности, поскольку фигурирует материал от разных людей, а о возможных физиологических и патологических колебаниях, но на существо расчета это не влияет. Как видно, дисперсия кон-

Таблица 4

Результаты 98 определений глобулинов по разности между общим белком (Б, биуретовый метод) и альбумином (А, бромкрезоловый метод) все концентрации в г/л

Б	А	Г	Б	А	Г	Б	А	Г	Б	А	Г	Б	А	Г
77	37	40	57	29	28	73	38	35	61	29	32	81	37	44
79	36	43	82	41	41	78	35	33	79	41	38	67	42	25
67	36	31	67	37	30	70	36	33	70	36	34	61	28	32
75	39	36	75	41	34	88	49	39	79	43	36	78	38	40
82	40	42	77	37	40	77	41	36	82	41	41	78	43	35
92	41	51	79	41	38	81	45	36	73	39	34	82	49	33
80	39	41	81	48	33	78	41	37	76	44	32	72	41	31
83	41	42	73	45	28	75	47	28	77	50	27	75	47	28
69	42	26	73	46	27	84	47	37	68	39	29	68	38	30
65	35	30	70	38	32	64	35	29	67	36	31	74	40	34
73	44	29	66	44	22	77	49	26	72	42	30	67	37	30
74	39	36	67	33	34	78	37	42	73	38	35	73	37	46
67	37	30	66	34	32	79	51	28	82	49	33	88	46	42
84	47	37	81	45	36	88	46	42	74	42	32	83	45	38
74	38	36	88	46	42	83	40	43	83	42	41	79	43	36
79	43	36	87	39	38	83	43	40	71	39	42	74	40	34
71	37	34	83	43	40	81	40	41	75	40	35	77	45	32
75	35	40	71	36	35	65	37	38	82	35	47	82	53	29
93	47	46	80	50	30	99	54	45	83	47	36	94	53	41
82	42	40	90	48	42	82	46	36						
Общий белок			$X_{ср}$ =76,7			σ^2=58,97			s = 7,68					
Альбумин			$X_{ср}$ =41,3			σ^2=27,57			s =5,25					
Глобулины			$X_{ср}$ =35,4			σ^2=31,89			s =5,65					

центраций общего белка заметно выше, чем альбумина. Теоретически, если бы концентрации белка и альбумина были друг от друга независимы, дисперсия глобулинов была бы равна сумме дисперсий альбумина и общего белка. Однако, фактически этого нет - дисперсия концентраций глобулинов заметно ниже, она даже ниже, чем альбумина. Это объясняется тем, что у обследованного контингента обе концентрации связаны - у тех, у кого общий белок был ниже, концентрация альбумина также была понижена. Для проверки был сделан «фиктивный» расчет - глобулины вычисляли, взяв данные альбумина не у того же пациента, у которого взяли общий белок, а у того, чей порядковый номер был на 20 больше, чем обеспечили независимость величин. В этом случае все получилось согласно теории - дисперсия концентраций глобулинов равна сумме дисперсий общего белка и альбумина.

2. Критерий хи-квадрат (χ^2).

В экспериментальных и в клинических исследованиях, чтобы узнать насколько различаются группы наблюдений -«контроль» и «опыт», их обычно сравнивают, используя критерии, вытекающие из свойств нормального распределения. Обычно стараются найти, как говорят «статистически значимые различия». В клинической лабораторной диагностике аналогичная задача часто формулируется иначе. Если ежедневно обследуется один и тот же контингент пациентов, можно ожидать что характер распределения результатов будет также одинаков. Интуитивно все мы это знаем - если вдруг много низких, или, наоборот, высоких величин, закрадывается сомнение, нет ли ошибок в методике. Желательно найти критерий, который бы количественно улавливал момент, когда такие опасения имеют право возникнуть. Самый простой критерий это средняя величина, но оценить вероятность того, насколько случайно ее изменение, можно только в том случае, если известен характер распределения, например, что оно нормальное, а это, как уже отмечалось, редко случается в лаборатории. Поэтому желательно иметь другой критерий, верный для любого распределения.

Критерий χ^2 (читается хи-квадрат) удовлетворяет этому требованию, он позволяет ответить на вопрос: какова вероятность того, что данное множество (полученные сегодня результаты) является случайной выборкой из более обширного множества (результаты, полученные ранее), не накладывая никаких ограничений на их характер. Задача ставится так: сегодня выполнено 100 исследований, столько-то результатов оказались

ниже 10 единиц, столько-то от 10 до 20 единиц, столько-то от 20 до 30 и т.д. Какова вероятность того, что если бы мы взяли несколько тысяч ранее выполненных анализов и «случайно надергали» из них 100 результатов, то получили бы сегодняшний набор ответов? Если эта вероятность велика, допустим 0,1, это означает, что подобный результат может быть раз в 10 дней, работа выполнена не хуже, чем она выполнялась всегда. Если же вероятность составляет 0.001 или меньше, это значит что такое событие можно ожидать раз в несколько лет (за 1000 рабочих дней!), или еще реже. В этом случае стоит подумать, действительно ли имеет место такое редкое явление, или же есть какая-то другая причина - изменение контингента больных или методическая ошибка. Изменение контингента больных установить просто: закрыли или открыли какое-то клиническое отделение, эпидемия гриппа, наступил или окончился отпускной период, если очевидной причины нет, надо проверить методику.

Использование критерия χ^2- начинается с того, что весь диапазон возможных результатов разбивают на классы и, анализируя имеющиеся материал, подсчитывают процент случаев, когда результат попадет в данный класс - например, концентрации общего белка меньше 65 г/л относят в первый класс, все случаи, когда она была 65-70 г/л, то во второй и т.д. Самое сложное это подобрать оптимальное расположение границ классов. Их не обязательно располагать на равном расстоянии друг от друга - один диапазон может быть большим, другой маленьким, но они должны быть такими, чтобы распределение случаев по классам было более или менее равномерным ни в одном из них не должно быть менее 4% всех случаев. С другой стороны расстояние между границами должно в несколько раз превышать точность метода, чтобы число случаев не зависело от случайных погрешностей.

Практически можно рекомендовать следующую тактику. Располагая массивом в несколько тысяч анализов и опираясь на границы нормы (справочные или референтные величины), устанавливают границы классов так, чтобы диапазон нормы делился на три-четыре части, и по 1-2 классам оставалось вне этих границ. Верхний диапазон всегда можно разбить на несколько частей, с нижним сложнее, так как в ряде случаев нижняя граница нормы совпадает с нулем или близка к нему. После этого подсчитывают процент случаев, который приходится на каждый диапазон (класс) и меняют границы, добиваясь по возможности равномерного распределения. Практически такую работу можно выполнить только располагая компьютером. Фиксируется с точностью до десятой процента

доля всех результатов, которые оказываются в каждом классе. Желательно, чтобы классов было больше, но, по нашему опыту редко удается установить их более 7 - либо расстояние между границами оказывается соизмеримым с точностью метода, либо крайние классы слишком малы. Полученное распределение считается должным и с ним сверяются ежедневные результаты.

Метод оправдывает себя, если ежедневно выполняется достаточное количество исследований данного вида. Сначала вычисляют число случаев, которое ожидается в каждом классе, для этого общее число выполненных сегодня анализов умножают на долю, которая должна попасть в данный класс:

$$n = v\,N$$

где :

v -ожидаемая доля результатов,

N - общее число выполненных сегодня исследований,

n - ожидаемое число исследований в данном классе.

Результаты часто получаются дробные в том смысле, что в данном классе ожидается не целое число случаев, а допустим 10,4. Это не должно смущать, поскольку речь идет о вероятности. Для каждого класса различие между ожидаемым (n) и фактическим (H) числом случаев возводят в квадрат и делят на ожидаемое число случаев. Полученные величины суммируют. Сумма называется критерием хи-квадрат и обозначается χ^2, расчет ведется по формуле:

$$\chi^2 = \frac{(n_1 - H_1)^2}{n_1} + \frac{(n_2 - H_2)^2}{n_2} + \frac{(n_3 - H_3)^2}{n_3}$$

где n ожидаемое число, H фактическое число результатов для класса с данным номером.

В справочниках по математике приводится формула для вычисления вероятности события (P), исходя из критерия хи-квадрат и числа степеней свободы, но проще пользоваться таблицей 5, в которой указывается величина χ^2, соответствующая определенной вероятности события. Под степенью свободы понимается число классов, на которые разбит весь диапазон возможных значений минус один. Смысл такого названия понятен - если, допустим, всего 8 классов и число случаев в 7 из них известно, нетрудно подсчитать, сколько же остается для восьмого. Его содержание несвободно, оно зависит от того, что содержится в первых семи.

Таблица 5

Оценка результатов определения общего белка по критерию χ^2

классы г/л	<65	65-68	69-73	74-76	77-81	82-85	>85	всего	χ^2	P
ожидание %	11,8	15,9	26,1	17,1	18,2	7,9	3,0	3896		
дата	число случаев									
1/7/97	5	8	13	14	24	22	9	95	57,2	<0,001
2/7/97	20	26	39	17	14	0	0	116	23,8	<0,001
3/7/97	3	8	11	14	26	23	15	100	101	<0,001
4/7/97	39	31	32	9	1	4	0	116	86,5	<0,001
7/7/87	13	20	33	18	19	10	4	117	1,0	>0,95
8/7/97	5	6	16	9	26	12	4	78	24,3	<0,001
9/7/97	5	8	31	31	27	5	9	116	30,3	<0,001
10/7/97	4	9	23	12	24	11	10	93	31,8	<0,001

В таблицах 6 - 9 приведены результаты исследований общего белка, билирубина и аминотрансфераз, выполненные в одной из лабораторий в первой декаде июля. Во второй строке каждой таблицы указаны границы классов, а в третьей приведено общее число ранее выполненных анализов, распределение которых было взято за эталон, и указаны проценты, которые приходятся на каждый класс. Как видно, достоверность результатов определения общего белка вызывает большие сомнения: день на день совсем не похож. Иное дело билирубин и аминотрансферазы, здесь распределения хорошо совпадают. Для билирубина исключения составляют 1 июля, когда было много низких результатов, и 4 июля, когда было много высоких. В такие дни надо проверить методику: низкие величины могли получиться вследствие погрешности при приготовлении диазореактива. 22 патологических результата 4 июля также требуют анализа - действительно ли в этот день были более тяжелые пациенты. В данном случае это правдоподобно, потому что доля патологических результатов при определении аланинаминотрансферазы также высока и число пограничных значений аспарагиновой аминотрансферазы было выше, чем в другие дни.

3. Нормальное распределение.

Среди огромного количества возможных распределений или форм гистограмм особое место занимает так называемое Гауссово или нормальное распределение, которое часто (но не всегда) достаточно близко описывает множество полученных данных. Гауссово распределение непрерывное, поэтому когда речь идет о дискретных величинах, как, например, лабораторные данные, подразумевается, что площадь под определенным участком Гауссовой кривой соответствует числу результатов, которые попали в данный интервал. Существуют методы, которые позволяют оценить, насколько это совпадение убедительно, или как говорят статистики, значимо. Об этом речь пойдет ниже.

Нормальное распределение характеризуется двумя параметрами: средней арифметической и средним квадратичным отклонением. В практических вычислениях используются не сами эти величины, а их оценки, различие между этими понятиями можно показать на следующем примере. Допустим, нас интересует статистика концентраций гемоглобина, но мы не можем располагать данными анализов всех людей (как говорят, генеральной совокупности) и даже какой-либо отдельной группы - женщин или мужчин или школьников, а судим о них по ограниченной

Таблица 6

Оценка результатов определения общего билирубина по критерию χ^2

классы мкмоль/л	<6	7-8	9-10	11-12	13-17	18-21	>21	всего	χ^2	P
ожидание %	7,4	15,7	30,4	15,0	19,9	5,5	6,1	11822		
дата	число случаев									
1/7/97	17	9	38	12	12	3	4	95	23,8	<0,001
2/7/97	11	19	37	19	22	3	5	116	3,4	>0,7
3/7/97	5	20	28	16	25	2	6	102	5,6	>0,5
4/7/97	9	14	28	14	24	5	22	116	35,1	<0,001
7/7/87	7	20	32	23	20	6	8	116	3,1	>0,8
8/7/97	12	19	18	13	11	4	1	78	16,3	>0,02
9/7/97	11	22	36	17	22	5	3	116	4,2	>0,3
10/7/97	6	10	28	9	19	13	8	93	16,3	<0,02

Таблица 7

Оценка результатов определения аспартатаминотрансферазы по критерию χ^2

классы ед.	<10	10-14	15-20	21-29	30-40	41-60	>60	**всего**	χ^2	P
ожидание %	3,1	16,0	39,3	24,9	8,2	4,4	4,2	7399		
дата	**число случаев**									
1/7/97	1	16	38	14	9	4	2	84	5,8	>0,3
2/7/97	2	15	24	11	4	4	3	63	4,7	>0,5
3/7/97	7	12	39	22	10	2	3	95	8,5	0,2
4/7/97	4	9	31	25	14	1	3	87	12,0	0,05
7/7/87	4	16	30	15	9	3	5	82	4,7	>0,5
8/7/97	4	18	27	13	2	2	1	67	11,3	<0,1
9/7/97	6	18	30	22	3	1	1	81	12,7	<0,05
10/7/97	3	14	34	16	5	3	7	82	5,5	0,5

Таблица 8

Оценка результатов определения аланиновой аминотрансферазы по критерию χ^2

классы ед.	<10	10-14	15-20	21-29	30-40	41-60	>60	всего	χ^2	P
ожидание %	17,5	32,3	20,6	13,8	6,0	4,5	5,2	8903		
дата	число случаев									
1/7/97	19	28	17	10	3	3	4	84	2,6	>0,8
2/7/97	8	26	11	9	3	0	6	63	8,0	>0,2
3/7/97	11	26	29	16	7	3	3	95	9,2	>0,1
4/7/97	8	28	21	9	9	9	2	86	15,5	<0,02
7/7/87	11	32	14	9	5	6	7	84	5,9	>0,5
8/7/97	9	22	16	14	2	2	2	67	5,5	>0,3
9/7/97	10	26	24	14	3	2	2	81	7,8	>0,2
10/7/97	12	26	16	14	3	6	5	82	3,4	>0,7

Таблица 9

Вычисления для гистограммы стандартного нормального распределения

диапазон значений тысячные доли единицы ОП	число случаев	расстояние от нижней границы диапазона до средней	то же, деленое на среднее квадратическое
408-415	2	408-440,1= -32,1	-32,1:13,14= -2,406
416-423	6	416-440,1= -24,1	-24,1:13,14= -1,806
424-431	13	424-440,1= -16,1	-16,1:13,14= -1,207
432-439	26	432-440,1= - 8,1	-8,1:13,14= -0,607
440-447	10	440-440,1= - 0,1	-0,1 :13,14= -0,007
448-455	9	448-440,1= 7,9	7,9:13,14= 0,592
556-463	12	456-440,1= 15,9	15,9:13,14= 1,192
464-471	3	464-440,1= 23,9	23,9:13,14= 1,792
		472-440,1= 31,9	31,9:13,14= 2,391

выборке, данные которой используем для оценки указанных параметров. Оценкой средней величины является средняя величина выборки, оценку среднего квадратичного отклонения вычисляют по формуле:

$$s = \sqrt{\sigma^2} = \sqrt{\frac{\sum\left(X_n - X_{cp}\right)}{n-1}}$$

где n число случаев. В дальнейшем изложении, как это обычно делается, мы не будем акцентировать это различие и употреблять выражение «среднее квадратичное» хотя на самом деле использовать его оценку.

Обычно используют стандартную форму или стандартное нормальное распределение, когда на горизонтальной оси (оси абсцисс) откладывают не абсолютные значения т.е. миллимоли или граммы, а то, во сколько раз данная величина превышает среднее квадратичное отклонение. Если на данную серию наблюдений распространяется закон нормального распределения, то в интервал от M-s до M+s должны попасть 68,3% всех результатов, а в интервал от M-2s до M+2s 95,5% всех результатов.

Если бы данные лабораторных исследований имели нормальное распределение, решение практических задач - определение границ нормы и сравнение массивов данных, упростилось бы. Дело в том, что в случае нормального распределения всегда можно точно ответить на два вопроса:

- какова вероятность, что две группы данных являются случайными выборками из общей (генеральной) совокупности, иными словами, насколько достоверно различие между ними,

- какое число результатов (или какая их доля) попадает в заданный интервал значений.

Если же распределение не является нормальным, на эти вопросы ответить сложнее. О достоверности различий речь шла в разделе о критерии хи-квадрат. Оценка доли результатов, которые попадают в определенный интервал, важна при установлении границ нормы (справочных или референтных значений). Никакая граница между нормой и патологией не может быть фетишизирована, поэтому возникает естественное желание объявить патологией такие значения, которые в норме встречаются редко или очень редко - например, меньше чем в 5%, или меньше, чем в 1% случаев.

В случае нормального распределения вопрос этот решается просто - зная среднее и среднее квадратичное отклонение, по соответствующим таблицам нетрудно вычислить границу, за которой оказывается определенная доля всех результатов. В случае ассиметричного распределения

такие расчеты неправомочны, поэтому разработаны методы, позволяющие определенным образом преобразовать несимметричное распределение, сделав его симметричным, подчиняющимся закону нормального распределения. Теоретически обосновать такое преобразования трудно, однако, практически оно осуществимо. Достигается это тем, что масштаб горизонтальной оси (абсцисс) делается неравномерным, сжимаясь по мере возрастания значений. На таком графике «хвост» кривой поджимается и график распределения становится симметричным. Фактически это означает ,что результаты анализов заменяют на меньшие, непропорциональные им, условные величины. При этом используются для каждого случая специально разработанные формулы. Для преобразованных *значений вычисляются среднее значение и среднее квадратичное отклонение*, опираясь на которые находят диапазон значений, ограниченный двумя или иным числом сигмальных интервалов. Если эти данные были получены на здоровых людях, они принимаются за границы нормы и обратно пересчитываются из условных величин в реальные.

Очень часто, когда говорят о нормальном распределении или строят его гистограмму, используют стандартную форму или просто стандартное нормальное распределение. В этом случае оперируют не абсолютными значениями исследуемого параметра, а относительными - во сколько раз оно больше среднего квадратичного отклонения. Рассмотрим как строится такой график на примере повторных измерений оптических плотностей, которые приведены в табл.1. Всего было выполнено 81 измерение, средняя величина 440,1 тысячной единицы ОП, дисперсия 175,76. В случае нормального распределения оценка средней величины есть средняя величина выборки т.е. также 440,1, но оценка дисперсии вычисляется путем деления суммы квадратов не на число наблюдений (n), а на n-1, соответственно она 177,96, а среднее квадратичное увеличивается до 13,34. Чтобы построить стандартное нормальное распределение вычисляют расстояние между границами классов и средней величиной и делят его на среднее квадратичное отклонение (табл 10):

Таким образом левая граница класса или диапазона значений оптической плотности от 0,408 до 0,416, в который попали результаты 2 измерений удалена от средней линии на расстояние -2,406, а правая на расстояние -1,806 величины среднего квадратичного отклонения. Знак минус тут означает, что речь идет о левой части рисунка, положительные же значения располагаются справа от средней линии (см. рисунок 2). Площадь под кривой на рисунке соответствует доле всех результатов, которые должны

Таблица 10

Вычисления для оценки характера распределения по критерию χ^2

граница в ед. ОП x 1000	нормированная граница (в долях s)	доля внутри границы	ожидание для данного класса доля	число случаев n	фактическое число случаев d	разность n - d	$(n-d)^2$	$\frac{(n-d)^2}{n}$
408	-2,406	0,4919						
			0,0274	2,22	2	0,22	0,05	0,02
416	-1,806	0,4645						
			0,0784	6,35	5	0,35	0,12	0,02
424	-1,207	0,3861						
			0,1583	12,82	13	0,18	0,03	0,00
432	-0,607	0,2278						
			0,2250	18,22	26	7,78	33,60	1,29
440	-0,007	0,0028						
			0,2285	18,51	10	8,51	72,42	7,24
448	0,592	0,2257						
			0,1575	12,76	9	3,76	14,14	1,57
456	1,192	0,3832						
			0,0803	6,50	12	5,50	30,25	2,52
464	1,792	0,4635						
			0,0280	2,27	3	0,63	0,04	0,01
472	2,391	0,4915						
								сумма 12,67

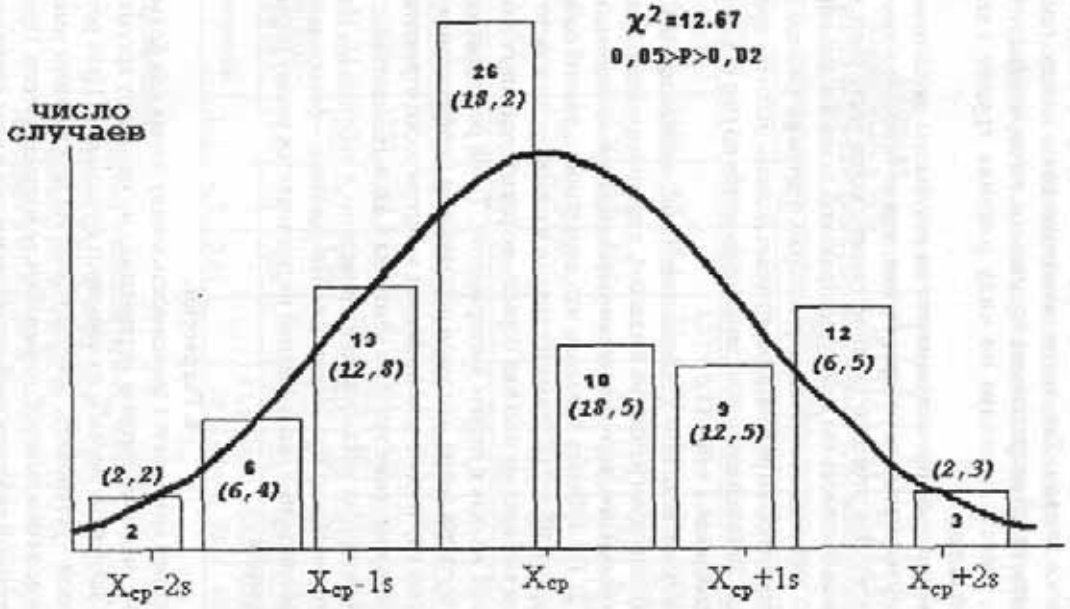


Рис. 2. Фактическое распределение результатов повторной фотометрии одного и того же раствора(столбики, прямые цифры) и нормальное распределение (кривая, курсив в скобках)

попасть в данный диапазон (принимая всю площадь под кривой за единицу), а высота столбиков соответствует доле результатов, которые туда фактически попали. Как видно, известная связь между тем, что следует ожидать, если распределение нормальное, и тем, что фактически получилось, имеется, однако по виду рисунка трудно сделать определенный вывод.

Количественно оценить, подчиняются ли результаты данного эксперимента закону нормального распределения, можно используя уже описанный метод χ^2. Для этого по таблице узнаем, какая часть (или доля) всех результатов оказалась бы между центральной линией и данной границей, если бы распределение было нормальным, а затем вычисляем долю и абсолютное количество результатов, которые должны были бы попасть в данный класс. Дальнейшие вычисления проводятся по уже описанным правилам (пример дан в табл. 11).

В данном случае величина χ^2 составляет 12.67, число степеней свободы 5, так как диапазон разбит на 8 классов, а предположение, что распределение нормальное, автоматически уменьшает число степеней свободы еще на 2. По таблице находим, что вероятность такого события находится между 0,05 и 0,02, иными словами в одном из 20 или 50 случаев случайная выборка из массива нормально распределенных данных получится такой же, как в нашем эксперименте. Такой результат делает сомнительным утверждение, что закон нормального распределения применим к данному случаю, но и не позволяет категорически отрицать это.

Результаты применения этого же критерия к данным некоторых клинических лабораторных исследований приведены в таблице 11. Из нее следует то, что очевидно без всяких точных расчетов - распределение результатов лабораторных исследований не подчиняется закону нормального распределения.

4. Регрессии.

Под регрессией понимается зависимость между двумя или большим числом величин, часть из которых независима - их называют аргументами, другие же зависят от первых, их называют функциями. Цель регрессионного анализа - установить, действительно ли между ними имеется зависимость, и если она имеется, то выразить ее математически. Практический лабораторный работник использует регрессии в двух случаях: при построении калибровок и при сравнении результатов двух аналитических методов.

Таблица 11

Оценка распределений результатов некоторых клинико-биохимических исследований (является ли они нормальными) по критерию χ^2

интервал				1	2	3	4	5	6	χ^2
должно быть в %%				2,28	13,6	34,1	34,1	13,6	2,28	
фактически оказалось (верхняя строка %%, нижняя абсолютные величины):										
	n	$X_{ср}$	s							
альбумин	2170	39,6	4,9	2,5 54	8,8 191	39,1 849	34,1 740	13,0 281	2,56 55	54
общий белок	2169	74,1	8,3	3,27 71	8,85 192	39,1 849	34,8 744	12,5 271	1,43 31	70
билирубин	2170	11,8	10,5	-	0,01 3	60,6 1315	35,1 762	2,9 63	1,24 27	977
АсАТ	1708	25,8	41,3	-	-	75,5 1279	21,7 371	1,41 24	1,41 24	1395
АлАТ	1611	23,7	52,9	-	-	78,5 1265	18,4 296	1,49 24	1,61 26	1480
щелочная фосфатаза	1330	162	117	-	-	71,2 947	20,6 274	4,14 55	4,06 54	924
мочевая кислота	1250	324	118	0,48 6	15,3 191	38,2 477	30,5 381	12,0 150	3,6 45	43
холестерин	1918	5,6	1,36	6,8 13	15,9 305	36,2 695	32,3 620	11,0 212	3,81 73	62
триглицериды	1545	1,8	1,04	-	7,06 109	54,4 841	27,2 420	7,07 119	3,62 56	344
мочевина	231	4,7	2,01	-	12,1 28	45,0 104	31,2 72	8,66 20	3,03 7	19

Примечание:

интервал 1 меньше чем $X_{ср} - 2\sigma$
интервал 2 от $X_{ср} - 2\sigma$ до $X_{ср} - \sigma$
интервал 3 от $X_{ср} - \sigma$ до $X_{ср}$
интервал 4 от $X_{ср}$ до $X_{ср} + \sigma$
интервал 5 от $X_{ср} + \sigma$ до $X_{ср} + 2\sigma$
интервал 6 больше чем $X_{ср} + 2\sigma$

На нынешнем этапе развития клинической лабораторной диагностики практически приходится иметь дело только с простым случаем, когда величин всего две, как это бывает при построении калибровочных графиков, когда по данным измерения оптической плотности на фиксированной длине волны вычисляются концентрации. Однако, в других областях аналитики, разработаны и более сложные методы, когда фотометрия проводится сразу на многих длинах волн и по этим данным одновременно вычисляются концентрации нескольких аналитов. В этом случае приходится изучать регрессионную зависимость между многими параметрами, можно думать, что через некоторое время такие методы найдут применение и в клинической лабораторной диагностике.

Таким образом речь идет о двух рядах связанных величин, каждой величине одного ряда соответствует определенная величина другого. Обычно независимую обозначают X, ту которая зависит от нее Y, величины нумеруют так, чтобы X_1 соответствовал Y_1, X_2 соответствовал Y_2, X_n соответствовал Y_n.

Самый простой вид регрессии это линейная, когда величины (например оптическая плотность и концентрация) пропорциональны друг другу:

$$Y = A + B*X$$

Здесь B это угол наклона, т.е сколько единиц концентрации (грамм/л или ммоль/л) приходится на единицу оптической плотности, а A значение оптической плотности холостого опыта, в котором исследуемое вещество отсутствует. A и B называются коэффициентами регрессии. На графике (рис. 3) такая калибровка имеет вид наклонной прямой линии, которая пересекает нулевую ординату в точке, которая соответствует концентрации A.

Применяемые в клинической лабораторной диагностике химические методы, как правило, хорошо отработаны несколькими поколениями исследователей, используемые в них реакции подчиняются закону Ламберта-Бера, поэтому линейный калибровочный график, аналогичный изображенному на рис. 3 раньше обычно строили на глаз, проведя по линейке линию, которая ближе всего проходит к имеющимся точкам. Однако, более точный результат получится, если подобрать такие коэффициенты регрессии, чтобы сумма квадратов расстояний между фактическими точками и теми значениями, которые получаются при расчете по калибровочному графику, была минимальна. Математический метод для проведения таких вычислений хорошо отработан, он называется методом наименьших квадратов. В случае двух коэффициентов используются формулы:

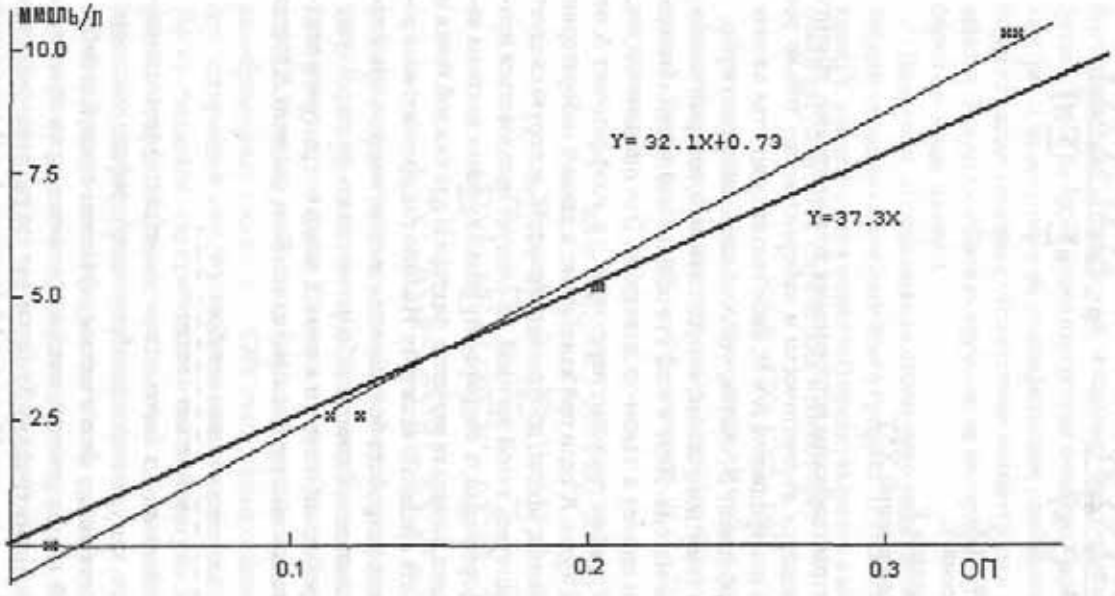


Рис. 3. Линейные калибровочные графики для определения холестерина.

X - оптическая плотность, Y - концентрация холестерина.

_____ калибровка проходит через нуль (1 параметр)

_____ калибровка необязательно проходит через нуль (2 параметра)

Холостые пробы	0.013	5.2	ммоль/л	0.195
	0.014	5.2	ммоль/л	0.196
2.6 ммоль/л	0.107	10.3	ммоль/л	0.334
2.6 ммоль/л	0.110	10.3	ммоль/л	0.338

$$A = \frac{\sum X^2 \sum Y - \sum X \sum XY}{n\sum X^2 - \left(\sum X\right)^2} \qquad B = \frac{n\sum XY - \sum X \sum Y}{n\sum X^2 - \left(\sum X\right)^2}$$

где

ΣX сумма значений X,

ΣY сумма значений Y,

ΣX^2 сумма квадратов X,

ΣXY сумма произведений X*Y

n число точек.

Многие фотометры снабжены встроенными компьютерами, обычно вычисление производится автоматически и лаборант видит только результаты - либо оба коэффициента A и B, либо только один - так называемый фактор - коэффициент B, считая, что A обязательно равно нулю.

Правомерно ли такое допущение, вопрос сложный, который должен решать разработчик метода. Дело в том, что обычно в описании метода указывается, что он линеен в таком-то диапазоне. Это понимается так, что калибровочный график проходит через нуль, т.е. коэффициент A по определению равен нулю. А если при калибровке в данной лаборатории оказалось, что это не так, значит, допущена неточность, которую следует исправить. Руководствуясь такой логикой, не следует пользоваться приведенными выше формулами, а оперировать только углами наклона калибровочного графика вычисляя значение фактора B для каждой точки и используя при расчете среднюю величину. Именно так организована работа вычислительных устройств большинства автоматических анализаторов - работнику дают возможность либо использовать фактор B полученный при калибровке, либо ввести в память компьютера ту его величину, которая записана в инструкции к методике. Коэффициент A всегда равен нулю.

$$B = \frac{\text{концентрация калибратора}}{\text{оптическая плотность}}$$

В хороших вычислительных системах используется еще дополнительный этап - после того, как уравнение калибровочного графика построено, вычисляется различие между фактическим значением каждой калибровочной точки и той концентрацией, которая окажется, если проводить расчет по калибровочному графику. Те точки, где это различие особенно велико, отбрасываются и вычисление коэффициентов A и B (или только фактора B) проводится заново.

Линейные калибровочные графики пригодны практически для всех биохимических определений, поскольку здесь закон Ламберта-Бера работает. Иное дело иммунохимические анализы - как турбидиметрические, так и основанные на специфическом связывании, где зависимость более сложная, обычно с увеличением концентрации угол наклона уменьшается. Такую калибровку вручную не построишь, поэтому используют более сложные приемы.

Возможно использование степенного ряда, который является логическим продолжением линейного графика. В этом случае значение функции (Y, концентрация вещества) представляется в виде комбинации степеней аргумента (X, оптических плотностей):

$$Y = A + BX + CX^2 + DX^3$$

Этот степенной ряд может состоять из любого числа членов, однако, обычно ограничиваются четырьмя, такая калибровка называется кубической. Чтобы вычислить коэффициенты A, B, C и D составляется система уравнений:

$$nA + B\sum X + C\sum X^2 + D\sum X^3 = \sum Y$$

$$A\sum X + B\sum X^2 + C\sum X^3 + D\sum X^4 = \sum XY$$

$$A\sum X^2 + B\sum X^3 + C\sum X^4 + D\sum X^5 = \sum X^2Y$$

$$A\sum X^3 + B\sum X^4 + C\sum X^5 + D\sum X^6 = \sum X^3Y$$

в которой в роли неизвестных выступают определяемые коэффициенты, а в роли коэффициентов - суммы значений различных комбинаций аргумента и функции. Здесь ΣX означает сумму всех X - оптических плотностей, ΣX^2 соответственно сумму квадратов оптических плотностей всех калибровочных точек и т.д., ΣXY сумму произведений каждого X на соответствующий ему Y , посчитанные по всем калибровочным точкам. Легко убедиться, что приведенные выше формулы для линейной калибровочной кривой есть частный случай кубической калибровки, (C и D при линейной калибровке равны нулю).

Очевидно, что коэффициенты в этом уравнении вручную посчитать нереально, а решается оно с помощью матриц, что может сделать только специальная компьютерная программа, работник лаборатории получает лишь окончательную информацию. На рис. 4 приведен пример такого калибровочного графика, составленного для случая определения гормо-

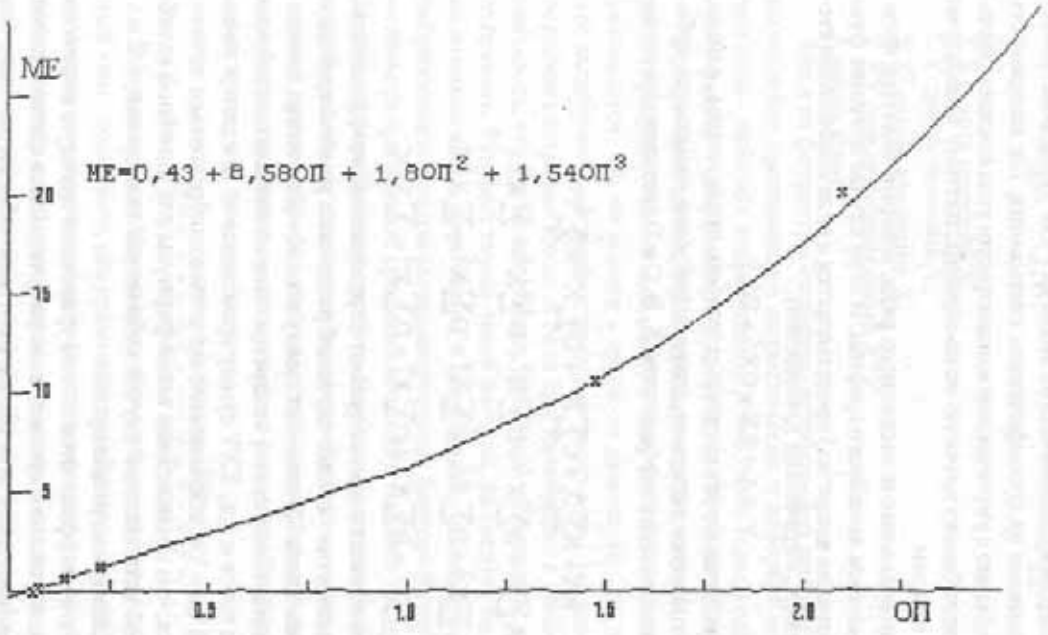


Рис. 4. Кубический калибровочный график для определения гормона иммуноферментным методом. ОП - оптическая плотность, МЕ - концентрация гормона в международных единицах.

ОП	МЕ	ОП	МЕ
0.056	0.06	0.229	1.46
0.073	0.17	1.477	13.30
0.138	0.73	2.152	25.10

на иммуноферментным методом. Как видно, точки достаточно хорошо укладываются на кривую. Фактически график как таковой врачу-лаборанту не нужен, компьютер сразу выдает окончательные значения. Посмотреть график стоит только для того, чтобы убедиться, что калибровочная кривая действительно проходит через полученные в эксперименте точки.

Возможен и другой вариант калибровочного графика, когда на одной из осей откладывают не саму величину, а ее логарифм или другую функцию, которую стараются подобрать так, чтобы график по возможности принял вид прямой линии. Соответственно говорят о логарифмическом или двойном логарифмическом калибровочном графике.

Логарифмическая калибровка - аналогична линейной, но вместо концентраций оперируют их логарифмами:

$$\log Y = A + B*X$$

здесь Y концентрация определяемого вещества, X оптическая плотность, A и B коэффициенты. Практически перед вычислением компьютер логарифмирует введенные значения концентраций, затем вычисляет A и B описанным выше методом наименьших квадратов. При выполнении анализа по приведенной формуле сначала вычисляется логарифм концентрации (log Y), а затем и сама концентрация. Возможна и двойная логарифмическая калибровка:

$$\log Y = A * \log X + B$$

в этом случае обе величины логарифмируются, а при выполнении расчета сначала вычисляется логарифм сигнала, затем логарифм концентрации и, наконец, сама концентрация. Двойное логарифмирование имеет смысл, главным образом, когда обе величины изменяются в значительных пределах, например, при нефелометрии. Дело в том, что оптическая плотность уже есть логарифм светового потока, поэтому рабочий диапазон ее изменений относительно невелик, а сигнал, полученный при измерении светорассеивания, так же, как и люминисценции или хемолюминисценции, может очень сильно варьировать. Та же калибровка, которая на рис. 4 дана в виде кубической кривой, на рис. 5 и 6 представлена как логарифмический и двойной логарифмический график. Легко заметить, две последние формы для данного случая не подходят - точки очень плохо ложатся на линию. Поэтому нельзя забывать, что линейная калибровка всегда одна, она либо подходит, либо не подходит, нелинейных же калиб-

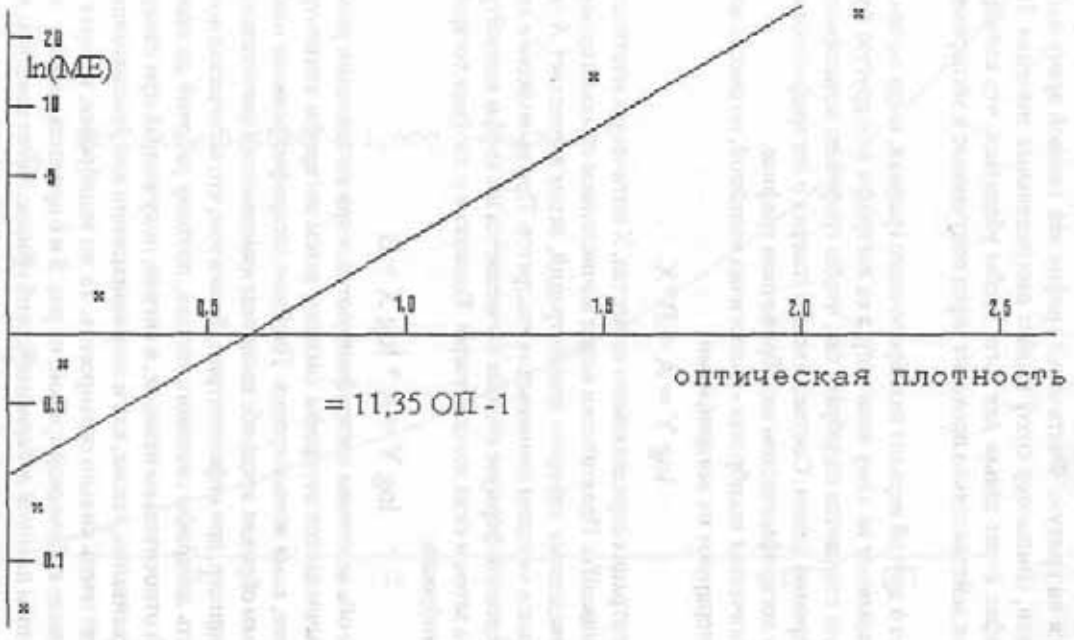


Рис. 5. Логарифмический калибровочный график

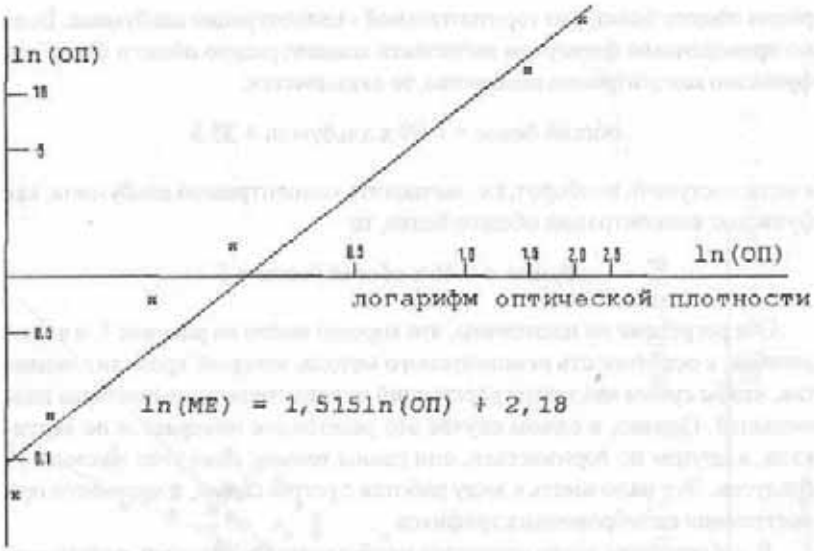


Рис. 6. Двойной логарифмический калибровочный график.

ровок огромное множество, каждый раз надо подбирать вариант, наиболее подходящий для данного случая. Решение во многом зависит от калибруемой методики, а также привычки и вкуса работника. В нашем примере кубический калибровочный график оказался заметно лучше логарифмических, однако возможна и такая ситуация, когда результаты примерно одинаковы. Поэтому современные анализаторы, в частности для иммуноферментных определений, дают возможность работнику самому выбрать вид калибровки.

Приведенные выше формулы для вычисления линейного уравнения вида Y=A + B*X используются также для вычисления регрессионной зависимости между двумя рядами величин - например, при сопоставлении результатов анализа одних и тех же проб разными методами или просто для выявления биологических закономерностей. Чем ближе величина B к единице, а A к нулю, тем теснее совпадают результаты. Используя этот метод, надо иметь в виду, что он не всегда даст однозначные результаты. Это видно на примере уже рассмотренной нами серии определения общего белка и альбумина у одних и тех же пациентов (табл. 4). Как уже отмечалось, эти величины связанные, что графически подтверждается рисунком 7, на котором на вертикальной оси отложены концент-

рации общего белка, а на горизонтальной - концентрации альбумина. Если по приведенным формулам вычислить концентрацию общего белка как функцию концентрации альбумина, то оказывается:

общий белок = 0.99 x альбумин + 35.8

а если поступить наоборот, т.е. вычислить концентрацию альбумина, как функцию концентрации общего белка, то

альбумин = 0.46 x общий белок + 5.7

Обе регрессии не идентичны, что хорошо видно на рисунке 7, и это не ошибка, а особенность используемого метода, который проводит линию так, чтобы сумма квадратов расстояний от всех точек до линии была наименьшей. Однако, в одном случае это расстояние измеряется по вертикали, в другом по горизонтали, они равны только, если угол наклона 45 градусов. Это надо иметь в виду работая с регрессиями, в частности при построении калибровочных графиков.

В лаборатории часто возникает необходимость сравнить результаты двух методов, например, рутинного для повседневной работы, и наиболее надежного и точного - так называемого референтного, который иногда называют золотым стандартом. Это можно сделать с помощью коэффициента корреляции R, который вычисляется по формуле:

$$R = \frac{\sum(X_n - X_{cp})(Y_n - Y_{cp})}{\sqrt{\sum(X_n - X_{cp})^2 \sum(Y_n - Y_{cp})^2}}$$

Здесь X_n и Y_n - соответствующие друг другу величины сравниваемых параметров, а X_{cp} и Y_{cp} их средние арифметические. Коэффициент корреляции может колебаться от 0 до 1, чем теснее связаны между собой оба параметра, тем ближе он к единице. Если, при сравнении результатов двух методов, коэффициент корреляции больше, чем 0,9, можно считать, что результаты хорошо сопоставимы. Если же коэффициент корреляции около нуля - 0,1 или 0,2, то считается, что обе величины независимы друг от друга.

Допустим, что кто-то, заметив, что концентрации общего белка и альбумина часто изменяются в одном и том же направлении (табл.2 и рис 7), решил, что можно отказаться от одного из этих анализов и вычислять концентрацию общего белка по приведенной выше формуле:

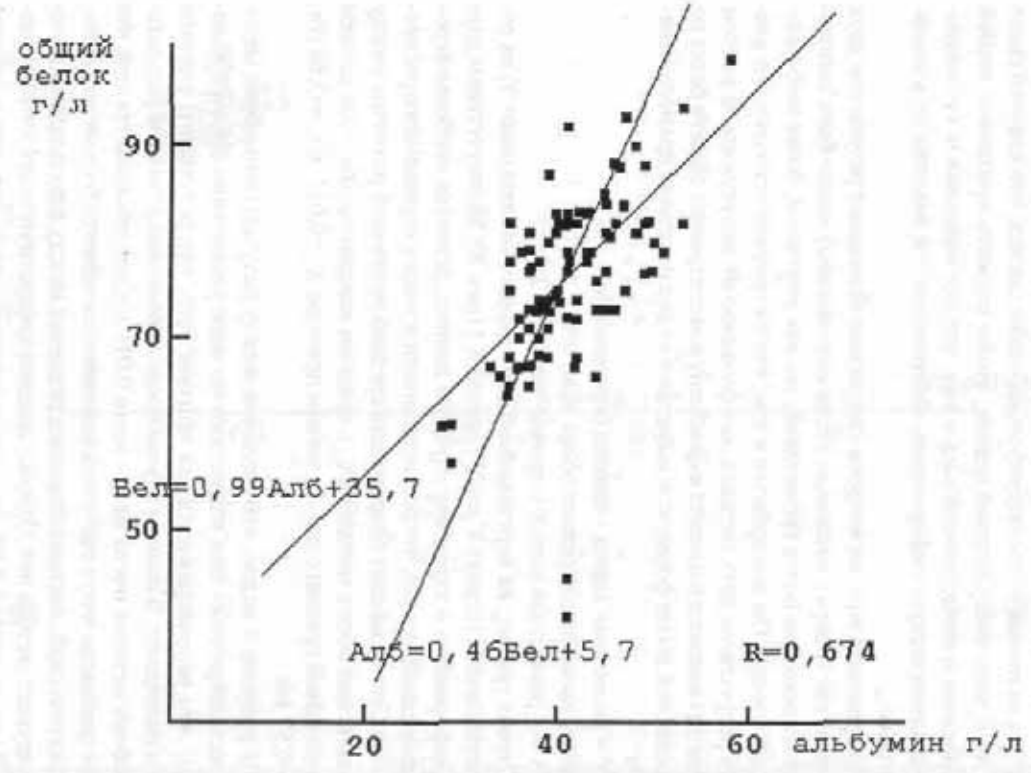


Рис. 7. Корреляция между концентрациями общего белка и ольбумина

общий белок = 0,99 x альбумин + 35,8

Правомерен ли такой подход ? Ответ можно получить вычислив коэффициент корреляции по приведенной формуле. В данном случае он 0,68. Эта величина недостаточно мала, чтобы сказать, что никакой связи нет, но и явно недостаточно велика, чтобы служить признаком тесной взаимосвязи и свидетельствовать о том, что обе методики несут одинаковую клиническую информацию. Фактически эти анализы не взаимозаменимы.

Для решения того же вопроса - насколько совпадают результаты двух методов (как говорят, насколько тесно они связаны) может быть использован и несколько более громоздкий, но, как считается, более информативный способ. Он заключается в том, что на графике откладывают разность результатов двух методов, как функцию их полусуммы. В данном случае для каждого пациента вычисляют концентрацию общего белка по приведенной выше формуле и вычитают из нее результат прямого измерения:

Y = расчетный метод - прямое определение,

затем вычисляют среднее обеих величин:

X = (расчетный метод + прямой метод) / 2

Строят график, на вертикальной оси которого откладывают Y, на горизонтальной X (строят Y как функцию X) (рис. 8). За отсутствием другой информации о характере разброса данных, делается наиболее вероятное предположение, что они подчиняются закону нормального распределения. Это позволяет оперировать средней величиной различия между результатами обоих методов ($X_{ср}$), средним квадратичным отклонением (s) и ошибкой среднего (m). В данном примере $X_{ср}$=0,011 .г/л, s=5,68 г/л, а m=0,57 г/л.

На рисунке 8 видно, что различия между результатами обоих методов ассиметричны - они возрастают по мере увеличения средней величины, что рассматривается как признак того, что результаты методов плохо совпадают. В данном случае средняя величина различий результатов обоих методов очень мала - всего 0.011 г/л, это объясняется тем, что почти одинаково часто расчетная величина оказывается больше или меньше фактической, систематического различия между результатами одного и другого метода нет. Однако, среднее квадратичное отклонение различий очень велико 5,68 г/л, оно практически такое же, как и среднее квадратичное концентрации белка 5,95 г/л . Интервал от X-2s до X+2s, в

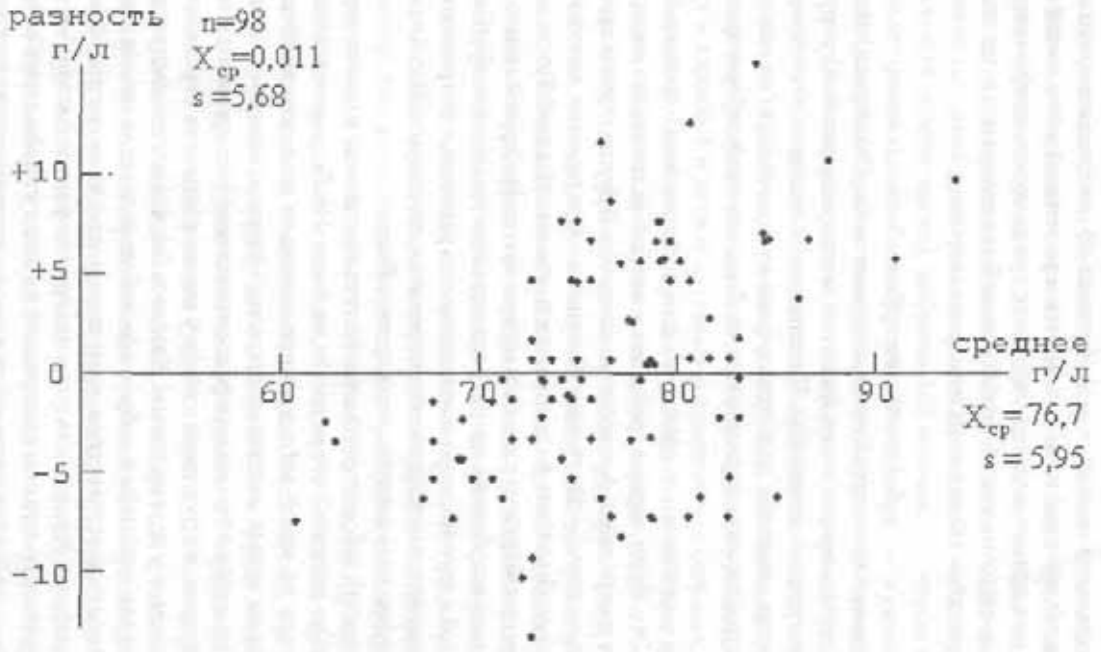


Рис. 8. Оценка сопоставимости результатов двух методов на примере прямого и расчетного определения общего белка. На горизонтальной оси отложена полусумма результатов сравниваемых методов, на вертикальной - их разности.

который должны попасть 95% всех различий между результатами обеих методов , простирается от - 11 г/л до +11.8 г/л, т.е. перекрывает весь диапазон нормальных значений общего белка 65-85 г/л. Очевидно, что измерение с такой ошибкой не имеет смысла и расчетный метод никак не может заменить прямое определение, несмотря на то, что коэффициент корреляции достаточно высок, чтобы можно было говорить о существовании определенной связи между этими показателями.

5. Сравнение групп.

Обрабатывая клинический или экспериментальный материал, часто приходится решать вопрос о том, имеют ли место различия между группами, или эти группы одинаковые. В клинической практике обычно вопрос ставится так - повлиял ли используемый метод лечения (или какая-либо процедура) на концентрацию гемоглобина или иной лабораторный показатель?

Для этого всех пациентов обследуют до и после лечения и сравнивают результаты. Это будет парное сравнение - каждой величине до лечения соответствует конкретная цифра после его окончания. В других случаях задача стоит несколько иначе - две группы больных лечили разными методами, повлиял ли способ лечения на длительность госпитализации? Тут нельзя каждой цифре одной группы соотнести конкретную цифру другой - никто из больных не имел «двойника», поэтому сравнение выполняется по группам. Хотя, между той и другой постановками задачи есть различие, и они решаются несколько различными математическими приемами, ситуации схожие: и в том, и в другом случае надо доказать, что различие было.

В клинической лабораторной диагностике постановка вопроса часто обратная - надо доказать, что различия не было. Необходимость в этом возникает, если по какой-либо причине изменили методику анализа - сопоставимы ли новые данные со старыми? Здесь возможно и парное сравнение - на одном и том же материале выполняют исследование и тем и другим методом, и групповое - когда у одних пациентов определяют старым методом, а у других новым. Казалось бы, различие между задачами, скажем так «прямой» и «обратной» небольшие - если нельзя доказать, что группы разные, значит они одинаковые, однако, это не так. Может быть очень высокая вероятность того, что группы разные, может быть и высокая вероятность, что они одинаковые, но между этими двумя полюсами есть большая «серая зона», когда нельзя с уверенностью сказать ни то, ни другое, как говорят, «пятьдесят на пятьдесят».

Фактически поставленный выше вопрос формулирован недостаточно четко -поскольку не определено, что такое различие между группами. Поэтому в статистике он ставится иначе - являются ли обе группы случайными выборками из одной и той же генеральной совокупности? Если вероятность этого велика - делается вывод, что группы «одинаковые», если мала, то что они «разные». Что такое генеральная совокупность, можно пояснить примером: допустим из очень большой группы людей (жителей целого города), выбраны 100 человек, у которых исследована концентрация гемоглобина. В этом случае говорят, что указанная группа людей есть «выборка из генеральной совокупности - жителей всего города». Любая другая группа жителей этого же города будет также выборкой из той же самой генеральной совокупности. Если этих людей отбирали по случайному признаку - например, обследованы только те, кто живет в квартирах с номером 13, выборка будет случайной - в нее попадут и взрослые и дети и здоровые и хронические больные. Если же их отбирали по какому-либо признаку, который может быть связан с концентрацией гемоглобина - например, только девочки 10-12 лет или только курильщики, это уже будет неслучайная выборка. Когда решают вопрос о том, есть различие между группами величин (множествами) или нет, оценивается какова вероятность того, что оба множества являются случайными выборками из одной и той же генеральной совокупности.

Чтобы оценить вероятность, имеется несколько критериев, каждый их которых подсчитывается по определенным правилам, о которых речь пойдет ниже. Под вероятностью понимается следующая ситуация - допустим, кто-то разбил всех жителей города, в котором равное число мужчин и женщин, на случайные группы по 10 человек, в каждой группе подсчитано соотношение мужчин и женщин. Ясно, что в большинстве случаев оно будет близко к тому, которое имеется в целом по городу, чем больше оно будет отличаться от среднего, тем меньше таких групп. Можно доказать, что 1% всех групп будет состоять из 9 мужчин и 1 женщины, а только из мужчин или только из женщин будет состоять по 0,1% всех групп. В этом случае говорят, что вероятность того, что конкретная группа состоит только из мужчин или только из женщин составляет 1:1000 или 0,001, а вероятность того, что в ней 9 женщин и 1 мужчина, 1:100 или 0,01.

Говоря о вероятности того, что две сравниваемые группы есть случайные выборки из общей генеральной совокупности, мы не можем утверждать, что оценили эту вероятность абсолютно правильно, а лишь что оценили вероятность с определенной вероятностью.

Такое рассуждение не имеет конца, чтобы выйти из него, оценивают пограничное значение - говорят, что вероятность того, что обе выборки из одной генеральной совокупности меньше какой-то величины, допустим 0,01 (обозначая <0,01). Такая маленькая вероятность означает признание, что выборки вероятнее всего из разных генеральных совокупностей.

Если распределение результатов нормальное, или есть основания считать, что оно нормальное, для решения вопроса о том, принадлежат ли обе выборки к одной генеральной совокупности, вычисляется критерий t Стюдента :

$$t = \frac{x_{1cp} - x_{2cp}}{\sqrt{\sigma_1^2 / n_1 + \sigma_2^2 / n_2}}$$

Здесь X_{1cp} и X_{2cp} средние значения обеих выборок, σ_1 и σ_2 оценки средних квадратичных для обоих групп, n_1 и n_2 количества наблюдений в них. Вероятность вычисляется по таблицам, которые учитывают значение параметра t и число степеней свободы, т.е. число наблюдений минус 1. Обычно принимается, что вероятность меньше 0,05 говорит о том, что между группами есть статистически значимое различие. Чтобы решить, что группы статистически значимо не различаются, вероятность должна быть больше 0,5, лучше 0,8 или 0,9. Это означает, что вероятность ошибки соответственно 20% или 10%.

Если же распределение не подчиняется закону нормального распределения (как это бывает для большинства лабораторных показателей), то решить вопрос о том, какой из трех случаев имеет место: выборки достоверно различаются, выборки достоверно не различаются и различие есть, но оно недостоверно, можно используя описанный выше метод χ^2.

Для сравнения групп пригодны и непарамерические критерии, которые так называются, потому что используют не параметры распределения - среднее арифметическое и дисперсию, а другие характеристики - ранги, инверсии, серии. К сожалению, сложилось так, что эти критерии разработаны в первую очередь для того, чтобы оценивать статистическую достоверность различий между группами, а в лабораторной диагностике чаще надо доказывать обратное - отсутствие таких различий.

Критерий знаков - это очень простой парный критерий, который можно использовать, если имеется определенное число пар наблюдений.

Допустим в серии из 20 проб один и тот же показатель исследован двумя методами - в пяти случаях получились одинаковые результаты, в шести первый метод дал более высокие результаты, а в девяти случаях второй был выше, чем первый. Критерий знаков учитывает число реже встречающихся знаков - в данном случае 6. Таком образом всего опытов 20, в 6 случаях первый метод дал более высокие значения. По таблице 12 находим, что 6 изменений знака в 20 опытах - это недостоверное различие. Если бы в данном примере критерий знаков получился 5, это бы означало, что различие достоверно с вероятностью 0,05, т.е. вероятность того, что заключение ошибочно, составляет 5%. Если бы критерий получился 4 или меньше, это означало бы, что различие достоверно с вероятностью 0,01, иными словами вероятность ошибки меньше, чем 1%.

Критерий Т (парный критерий Вилкоксона) - также относится к так называемым связанным выборкам - т.е. применяется в том случае, когда есть определенное число пар наблюдений. Для каждой пары определяют ранг - для этого вычисляют разность, отбрасывают знак и выстраивают абсолютные величины разностей в порядке возрастания. Ранг это порядковый номер абсолютной величины разности. Если разности одинаковые, всем парам присваиваются ранги, равные средней арифметической порядковых номеров одинаковых разностей. Затем вычисляется величина Т - сумма рангов всех пар, разность которых не соответствует общей тенденции. По таблице 13 находят вероятность того, что различие достоверно.

Например, в серии из 10 проб определяли концентрацию альбумина разными методами. Получились результаты (Табл. 13).

В этом примере в трех случаях второй метод дал более низкие результаты, чем первый, а в пяти было увеличение, поэтому не соответствует общей тенденции уменьшение, критерий Т = 8,5+3,5+6 = 18, согласно таблице 13, если наблюдений 10 и критерий Т больше 10, различие нельзя считать достоверным. Это, однако, еще не означает, что методы дают одинаковые результаты и могут считаться взаимозаменимыми. Мы показали только, что обнаруженные различия могли быть случайными, но ничего не знаем о совпадениях - насколько они закономерны. На этот вопрос ни критерий знаков (таблица12), ни критерий Т (таблица 13) в их обычной постановке ответа не дает.

Таблица 12

Вычисление достоверности различий по критерию знаков (максимальное число реже встречающихся знаков, при котором различие в парных сравнениях при данном числе наблюдений существенно)

n	p< 0,05	p< 0,01	n	p< 0,05	p< 0,01	n	p< 0,05	p< 0,01	n	p< 0,05	p< 0,01
5	0	-	15	3	2	40	14	12	80	32	19
6	0	-	20	5	4	50	18	16	90	36	33
8	1	0	25	7	6	60	23	20	100	41	37
10	1	0	30	10	8	70	27	24	150	64	60

Таблица 13

Достоверность различий по критерию Т (парному критерию Вилкоксона)

максимальные значения Т при которых различия между группами значимы											
n	p< 0,05	p< 0,01	n	p< 0,05	p< 0,01	n	p< 0,05	p< 0,01	n	p< 0,05	p< 0,01
5	0	-	9	8	3	13	21	12	17	41	28
6	2	0	10	10	5	14	25	16	18	47	33
7	3	0	11	13	7	15	30	19	19	53	38
8	5	1	12	17	10	16	35	23	20	60	42

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ

Подавляющее большинство работ, проводимых в клинико-диагностических лабораториях, неизбежно связано с потенциально опасными и вредными факторами, поэтому организации безопасности труда в лаборатории должно быть уделено особое внимание.

Приведенные ниже правила содержат общие требования техники безопасности, предъявляемые к помещению, оборудованию, работе с электроприборами, химическими и биологическими веществами, меры пожарной безопасности и оказания первой медицинской помощи при несчастных случаях.

В каждой лаборатории в соответствии со спецификой ее работы разрабатываются более подробные инструкции на основании действующих нормативных документов.

Требования к помещению лабораторий

Помещение лаборатории должно быть по возможности просторным и светлым, расположенным в том месте здания, где отсутствует вибрация. Нельзя размещать лаборатории вблизи котельных, дымовых труб и источников загрязнения воздуха.

Существенным является освещение помещения (большие окна, источники света, предпочтительны лампы дневного света, над каждым рабочим местом).

В каждой лаборатории должны быть хорошая вентиляция, водопровод с горячей водой, проводка технического тока, канализация, установки для дистилляции воды.

Общие требования к организации и проведению работ в лаборатории

Необходимо создать в лаборатории обстановку, обеспечивающую безопасность и облегчающую проведение работ. Это достигается путем рационализации работ, правильным размещением рабочих мест и оборудования, правильным выбором приборов и инструментов, экономным расходом материалов, правильным расходом рабочего времени.

Соблюдение чистоты в помещении, на рабочих местах, своевременное удаление мусора и отходов, правильное хранение инструментария, стекла, посуды, реагентов, наличие дезинфицирующих средств, средств индивидуальной защиты, пожарной безопасности, аптечки первой помощи - необходимые атрибуты каждой лаборатории.

В лаборатории запрещается: курить; хранить и принимать пищу, загромождать проходы и выходы; работать без спецодежды, производить посторонние работы; оставлять без присмотра включенные приборы (кроме рассчитанных на круглосуточную работу).

Уходя из лаборатории, нужно убедиться, что все водопроводные и газовые краны закрыты, электроприборы и свет выключены, все дорогие приборы и аппараты закрыты и спрятаны, материалы, представляющие опасность, убраны.

Каждый сотрудник лаборатории должен соблюдать правила личной гигиены - мыть руки до, во время и после работы, иметь индивидуальные средства защиты - халаты, перчатки, фартуки, защитные очки, респираторы, косынки и шапочки.

Персональные средства защиты

Перчатки - должны быть удобными и достаточно длинными. Грубые перчатки из неопрена, нитрила или бутилированной резины предназначены для химической защиты. Перчатки из латекса или винила обеспечивают кратковременную защиту и очищаются промыванием водой. Они легко повреждаются и их нужно регулярно проверять. Термостойкие перчатки используются при работах с повышенной температурой, металлизированные перчатки - при резке стекла, точке ножей.

Халаты - должны быть достаточно длинными и застегиваться полностью, спереди закрытыми, рукава - плотно охватывать запястья. Материал - сатин или молескин.

Комбинезоны из водозащитных тканей используют в работах, связанных с риском инфицирования. Одежда из тканей с абсорбирующим покрытием дополняется пластиковым фартуком или туникой. Одноразовые средства защиты должны удаляться сразу после загрязнения.

Защита лица и глаз обеспечивается защитными очками с противоударными стеклами и масками различной конструкции. При работе с едкими и летучими веществами нельзя пользоваться контактными линзами.

Для респираторной защиты используют различного типа респираторы в зависимости от характера опасности. От пыли - бумажные и тря-

почные маски, от паров и дыма - маски, закрывающие пол-лица, содержащие картридж с абсорбентом.

Правила безопасности при работе с химическими веществами.

По степени опасности все химические реактивы можно условно разделить на 8 групп (единой государственной классификации нет).

1. Взрывчатые вещества (ВВ).
2. Реактивы, выделяющие при реакции с водой легковоспламеняющиеся газы (металлический натрий, карбид кальция).
3. Самовозгорающиеся реактивы.
4. Легковоспламеняющиеся и горючие жидкости (ацетон, эфиры, бензин и др.).
5. Твердые вещества (сера, красный фосфор).
6. Окисляющие вещества (азотная кислота, нитраты, перманганат калия).
7. Физиологически активные вещества (нитрат бария, хроматы, бихроматы, фенол и др.).
8. Прочие - малоопасные и безопасные вещества (например, хлорид натрия, активированный уголь и др.).

Хранение различных химических веществ в лаборатории осуществляется с учетом их свойств.

Все реактивы должны храниться в банках с этикетками с указанием содержимого, условий и сроков хранения, предостерегающими надписями.

Правила работы с ядовитыми и сильнодействующими веществами

По своим физическим свойствам эти вещества могут быть также огне- и взрывоопасными, едкими веществами, могут являться реактивными и *медицинскими препаратами.*

Все работы с ними должны проводиться под тягой, в перчатках и защитных очках.

Пролитую жидкость следует немедленно нейтрализовать в соответствии с инструкциями, посуду тщательно обезвредить, одежду - дезактивировать и передать в стирку.

Ядовитые и сильнодействующие вещества хранят в специальном шкафу под замком и пломбой. Это касается и медицинских препаратов списков «А» и «Б».

Правила безопасной работы с огне- и взрывоопасными веществами.

К огнеопасным относятся легковоспламеняющиеся жидкости (ЛВЖ) с температурой воспламенения до 61°С (ацетон, эфир и др.) и горючие

жидкости (ГЖ) с температурой воспламенения выше 61°С (уксусная кислота, бутанол и др.).

Взрывоопасные вещества - нитроглицерин, пикриновая кислота, перекись водорода, соли хлорной кислоты, азиды металлов.

Все работы с ЛВЖ и ГЖ должны проводиться под тягой и при выключенных электроприборах и газовых горелках. Помещение должно быть оборудовано средствами пожаротушения. Хранить эти вещества в холодильниках не рекомендуется. Категорически запрещается совместное хранение ЛВЖ, ГЖ и взрывоопасных веществ с кислотами, щелочами, окислителями, самовоспламеняющимися веществами, легко горючими материалами (вата, бумага, хлопок, древесные щепки).

Правила безопасной работы с едкими веществами (кислотами, щелочами).

К едким жидкостям можно отнести любые жидкости с pH < 2,1 или > 12,5 (по американским стандартам).

Минеральные кислоты вызывают химические ожоги при попадании на кожу, щелочи оказывают некротическое действие. При работе с едкими веществами обязательно пользоваться средствами индивидуальной защиты (перчатки, очки).

Запрещается приливать воду к кислоте, набирать жидкости ртом через пипетки. Разлитые едкие вещества следует немедленно засыпать сухим песком, удалить его и промыть это место водой.

При ожогах кислотой пораженное место промыть обильно водой, затем раствором питьевой соды, а глаза - водой. При попадании щелочи на кожу – промыть водой, а затем 1% раствором уксусной кислоты, глаза - водой, а затем 2% раствором борной кислоты.

Токсичность

Этот термин может быть отнесен к большинству веществ и зависит от количества. Например, аспирин, витамины и даже вода при приеме в больших количествах токсичны. Токсичность может быть кратко- и долговременная. К сильнодействующим относятся вещества, оказывающие токсическое действие при кратковременном воздействии. Чем ниже концентрация, вызывающая токсический эффект, тем токсичнее вещество.

Раздражающие вещества воздействуют на слизистую оболочку, кожу, глаза.

Сенсибилизаторы (полиметиновые красители, сернистые соединения и др.) вызывают аллергию при многократном воздействии.

Большинство газов вызывает удушье (асфиксическое воздействие).

Среди долгодействующих токсинов можно выделить мутагенные вещества, вызывающие генетические изменения. Существуют специальные тест-системы для определения потенциальных мутагенов. Некоторые вещества воздействуют на репродуктивную систему и новорожденных. Канцерогены (например, азокрасители, ароматические амины и др.) способствуют образованию доброкачественных и злокачественных опухолей. Время воздействия, достаточное для возникновения токсического эффекта, сильно варьирует.

Персонал, работающий с токсическими веществами, должен быть обучен, должен использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.

Правила безопасной работы с ртутью

Металлическая ртуть применяется в приборах для измерения температуры и давления, в выпрямителях электрического тока, в полярографических и электрохимических исследованиях и т. д. Приборы и аппараты, содержащие ртуть, должны устанавливаться на эмалированных противинях и располагаться вдали от дверей, проходов, нагревательных и отопительных приборов. Категорически запрещается выливать ртуть в канализационные раковины - для сбора ртути используют стеклянную толстостенную банку с водой, закрываемую резиновой пробкой. Случайно пролитую ртуть собирают с помощью стеклянной ловушки с резиновой грушей, а ее мельчайшие капельки - амальгамированными пластинками или кисточками из белой жести, а также ветошью, смоченной 0,1% раствором перманганата калия, подкисленного соляной кислотой. Затем поверхность обрабатывают 20% водным раствором хлорного железа и промывают водой.

Радиационная опасность

Работа с радиоактивными веществами, применяемыми в различного рода исследованиях, требует очень большой осторожности.

Радиация вызывает лимфоцитолиз, разрушает эпителий. Низкие уровни радиации могут вызвать генетические изменения.

Все лица, работающие с радиоактивными веществами, должны соблюдать все требования по охране труда, технике безопасности и личной гигиене и сдать соответствующий минимум. В лабораториях необходимо систематически проводить измерение радиоактивной загрязненности и иметь аварийный запас дезактивирующих средств.

Требования к оборудованию и устройству лабораторий, в которых проводятся работы с радиоактивными веществами, зависят от природы используемых изотопов и интенсивности радиации. В радиоиммунном анализе наиболее часто используют изотопы трития - ^{3}H, углерода - ^{14}C, фосфора - ^{32}P и серы - ^{35}S.

Эти изотопы относятся к β-излучателям (β-распад – самопроизвольное превращение ядер, сопровождающееся испусканием, или поглощением, электрона и антинейтрино или позитрона и нейтрино) и имеют довольно длительный период полураспада.

При работе с этими изотопами излучение не превышает более чем в 10 раз допустимый уровень и не представляет большой угрозы для здоровья. Однако требуется соблюдение некоторых правил.

1. Все работы должны проводиться в вытяжном шкафу.

При работе с жидкими радиоактивными веществами не требуется каких-либо дополнительных фильтров и ловушек.

2. Открытые радиоактивные вещества должны храниться в контейнерах из термостойкого материала (например, стали).

3. Рекомендуется использовать подносы, дно которых покрывают гофрированной хлопковой тканью, сменяемой время от времени.

4. Запрещается пипетирование ртом. Необходимо использовать автоматические пипетки.

5. При работе с изотопами углерода, трития и серы не требуется защитных экранов. При работе же с изотопом фосфора необходимо использовать экран из плексигласа (оргстекла) толщиной 1 см.

6. Рекомендуется использовать небольшие ручные мониторы и полиэтиленовые перчатки, особенно при работе с водой, содержащей ^{3}H.

7. Жидкие радиоактивные отходы, промывные воды собирают в пластиковые бутыли (не выливать в канализацию !) и передают в специальные организации.

Твердые отходы (фильтровальная бумага, ионообменные смолы, перчатки и др.) помещают в полиэтиленовые коробки, которые запечатывают сваркой.

8. При утечке радиоактивных материалов информировать соответствующие службы, быстро начать обеззараживание.

Правила безопасной работы с электрооборудованием и электроприборами

При работе с электрооборудованием и приборами возможны случаи поражения электротоком и возникновение пожара. Причинами могут служить: работа с неисправными оборудованием, розетками, проводкой, рубильниками; нарушение инструкций по эксплуатации, прикосновение руками или металлическими предметами к токоведущим элементам, нарушение правил применения индивидуальных средств защиты. Новые приборы должны быть проверены перед их эксплуатацией. Ремонт оборудования производится только специалистами.

Все электроприборы должны быть заземлены; не рекомендуется использовать удлинители; нельзя оставлять без надзора включенные приборы.

В случае возникновения загорания – немедленно отключить напряжение и использовать для тушения порошковые огнетушители, песок, асбест.

Специальное оборудование

Безопасность персонала при эксплуатации изделий медицинской техники должна обеспечиваться:

- конструкцией изделия, удовлетворяющей требованиям стандартов;
- достаточной квалификацией обслуживающего персонала;
- системой технического обслуживания и ремонта;
- соответствием помещения действующим нормам;
- применение установленных мер и средств защиты.

При эксплуатации приборов и аппаратов необходимо руководствоваться инструкциями и правилами, изложенными в техническом паспорте.

В процессе эксплуатации аппаратуры должна быть исключена возможность ее падения; запрещается прикасаться к движущимся и вращающимся частям приборов.

При работе с центрифугами необходимо плотно закрывать их и не открывать до полной остановки ротора во избежание механических травм. Запрещается помещать в термостаты ЛВЖ. Чистить термостаты только после отключения от сети. Электроплитки, муфельные печи и другие нагревательные приборы должны быть установлены на термоизолирующем материале.

Невозможно перечислить все возможные опасности при эксплуатации различных приборов. Главное – соблюдение инструкций и основных правил техники безопасности.

Биологическая безопасность

Все клинические образцы (кровь, моча и другие биожидкости) являются потенциальными источниками инфекции, например, гепатита, СПИДа.

Сотрудники микробиологических лабораторий испытывают дополнительный риск, связанный с патогенами, которые они исследует или культивируют. Помимо образцов крови, другие биожидкости (серозная, амниотическая, плевральная, перитонеальная, перикардиальная, спинномозговая, семенная жидкость, влагалищный секрет) могут служить источниками инфекции. Другие клинические образцы, как фекалии, слюна, моча, желудочный сок, мокрота, пот, слезная жидкость, менее опасны, если не содержат видимое количество крови. Заражение возможно при наличии даже небольших порезов и ссадин, при разбрызгивании биожидкостей, при контакте с зараженными поверхностями (телефонная трубка, клавиатура), вдыхании паров и аэрозолей.

Сотрудники клинико-диагностических лабораторий при анализе клинических образцов и проведении бактериологических исследований должны строго соблюдать общие правила техники безопасности и личной гигиены.

При распаковке инфекционного материала, присланного в лабораторию для исследования, банки и пробирки, содержащие материалы, обтирают дезинфицирующим раствором и ставят на металлические подносы, кюветы или в штативы.

При проведении бактериологических исследований с инфекционным материалом должны соблюдаться следующие правила:

а) перед работой тщательно проверяют целость стеклянной посуды, проходимость игл и поршней у шприцев;

б) запрещается прикасаться к исследуемому материалу и конденсату воды в засеянных чашках руками. Работу с инфекционным материалом следует проводить с помощью инструментов (пинцетов, игл, петлей, корнцангов и т. д.);

в) посев в пробирки и чашки Петри проводить около горящей горелки с обжиганием петли, шпателя и краев пробирки;

г) переливание инфекционных жидкостей из сосуда в сосуд через край не допускается;

д) при посеве инфекционного материала на пробирках, чашках, колбах, флаконах и прочей посуде делают надписи с указанием названия материала, номера анализа и даты посева;

е) в комнате, предназначенной для обработки и посева инфекционного материала, запрещается проводить другие виды работ;

ж) в процессе работы и после окончания работы используемые предметные стекла, пипетки, шпатели погружают на одни сутки в банки с дезинфицирующим раствором, затем моют и кипятят;

з) посуду с использованными питательными средами, калом, мочой и другими материалами, взятыми от инфекционных больных, собирают в баки и обеззараживают автоклавированием, обрабатывают дезинфицирующим раствором или кипячением;

и) запрещается оставлять на столах нефиксированные мазки, чашки Петри, пробирки и другую посуду с инфекционным материалом;

к) поверхность рабочих столов обрабатывают дезинфицирующим раствором, руки обмывают дезинфицирующим раствором, а затем моют в теплой воде с мылом, как после окончания работы, так и при перерыве в работе, при выходе из помещения;

л) при уборке помещения в конце рабочего дня полы моют с применением дезинфицирующего раствора, стены, двери, полки, подоконники, окна, шкафы и др. протирают дезинфицирующим раствором;

м) дезинфекционные работы персонал должен проводить в резиновых перчатках.

Средства дезинфекции

Термин «бактерициды» относится к любым веществам, которые убивают патогенные агенты. Они делятся на 3 категории:

- стерилизующие вещества - они полностью разрушают все инфекционные агенты, включая микобактерии и споры;
- дезинфицирующие средства, эффективные против селективных микроорганизмов. Спектр их действия обычно указан на этикетке или известен по литературе. Они не действуют на споры и микобактерии. Для их эффективного воздействия требуется определенное время (указанное в инструкции);
- антисептики - химические бактерициды, используемые для обработки кожи, тканей, слизистых оболочек. Их не используют в качестве лабораторных дезинфицирующих средств.

Все лабораторное оборудование и инвентарь, контактировавшие с биологическим материалом, подлежат соответствующей обработке, метод обеззараживания выбирается с учетом вида материала, конструктивных особенностей изделий и технических возможностей лаборатории.

Использованные изделия ополаскивают водой в какой-либо емкости. Промывные воды обеззараживают кипячением или обрабатывают раствором хлорной извести (200 г. на 1 л воды). Изделия, предназначенные для непосредственного контакта с пациентом, обрабатывают в соответствии с ОСТ 42-21-85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения». Пипетки, наконечники и другие мелкие лабораторные инструменты погружают полностью в какой-либо раствор дезинфектантов (3% раствор хлорамина, 6% раствор перекиси водорода с добавлением 0,5% раствора моющего средства, 4% раствор формалина и др.). Если изделие имеет внутренние каналы, дезинфицирующий раствор предварительно прокачивают через них с помощью резиновой груши для удаления остатков биоматериала, затем погружают в раствор. Емкости, содержащие дезинфицирующие растворы, должны быть промаркированы с указанием названия и концентрации \дезинфеканта. Все растворы используются однократно.

Правила сбора, хранения и удаления отходов.

Все отходы, образующиеся в лечебно-профилактических учреждениях, по степени их эпидемиологической, токсикологической и радиационной опасности делятся на пять классов:

А - неопасные,

Б - опасные (рискованные),

В - чрезвычайно опасные,

Г-отходы, близкие по составу к промышленным,

Д - радиоактивные.

В клинико-диагностических лабораториях образуются, в основном, неопасные отходы, которые не имели контакта с биожидкостями (например, бумага, мусор), потенциально опасные - отходы, загрязненные биологическими материалами, а также отходы класса Г -просроченные реагенты и лекарственные средства, диагностические препараты, использованные или просроченные дезинфицирующие средства, отходы ртути, а также радиоактивные отходы, если в лаборатории используется радиоактивный анализ. Отходы различных классов собирают в отдельную тару. Их нельзя смешивать.

Сбор отходов класса А осуществляется в многоразовые или одноразовые емкости (пакеты), которые доставляют к местам установки контейнеров и перегружают в них. Многоразовую тару моют и дезинфицируют.

Все отходы класса Б, образующиеся в лаборатории, дезинфицируют и собирают в герметичную одноразовую упаковку (предметы и материалы одноразового использования), удаляют из лаборатории и помещают в контейнеры для данного класса отходов, установленные в определенном месте на территории ЛПУ.

Отходы класса Г собирают и упаковывают в зависимости от степени их токсичности (в соответствии с «Временным классификатором токсичных промышленных отходов и методическими рекомендациями по определению класса токсичности промышленных отходов». Утверждены МЗ СССР 13.05.1987 г., № 4286-87).

Кислоты и щелочи нейтрализуют и сливают в канализацию. Горючие вещества собирают в отдельную емкость.

Сбор, хранение и удаление радиоактивных отходов осуществляется в соответствии с нормативными документами, регламентирующими обращение с радиоактивными веществами.

Руководителем ЛПУ по согласованию с ЦГСЭН утверждается инструкция, устанавливающая правила обращения с отходами, персональную ответственность, схему сбора, промежуточного хранения и удаления отходов в зависимости от их состава и количества.

Пожарная безопасность

Причинами возникновения пожаров в лаборатории могут стать: открытое пламя, курение, неисправность нагревательных приборов, электросети, статическое электричество. Для предупреждения пожаров следует соблюдать правила техники безопасности при работе с огне-, взрывоопасными и летучими веществами, не производить работы с ними вблизи источников горения, организовать правильное хранение этих веществ. Каждое рабочее место должно быть снабжено средствами для тушения пожаров. Обязательно наличие сухого песка, пенного и углекислотного огнетушителей, асбестового одеяла.

Применение пенных огнетушителей приводит к порче оборудования и реагентов, поэтому их рекомендуется использовать лишь для тушения крупных очагов пламени, когда другие средства малоэффективны. Водой нельзя тушить не смешивающиеся с ней жидкости (бензин, толуол и т. п.), а также бурно реагирующие с ней вещества (например, щелочные металлы). Небольшие очаги пламени иногда легко ликвидировать, засыпав их сухим песком или накрыв асбестовым одеялом. Вме-

сто песка можно использовать сухие порошковые огнетушители. Пролитые огнеопасные жидкости также засыпают песком, который затем удаляют из лаборатории.

Наиболее эффективными средствами тушения пожара являются углекислотные огнетушители, имеющийся в них диоксид углерода не содержит воды и не повредит оборудование. Они пригодны для тушения практически любых вспышек и пожаров на небольшой площади, но ими нельзя тушить горящую на человеке одежду, для этой цели используют асбестовые или войлочные одеяла.

При воспламенении электрических приборов и проводов следует в первую очередь отключить электричество, затем потушить огонь углекислотным огнетушителем или песком.

Средства тушения пожара и их применение

Средство тушения	Используют при возгорании:	Нельзя использовать при возгорании:
Вода	бумаги, древесины, тканей	Электрооборудования, щелочных металлов, горючих жидкостей, не смешивающихся с водой
Углекислотные огнетушители	воспламеняющихся жидкостей и газов, электрооборудования	бумаги, щелочных металлов
Порошковые огнетушители (универсальн.)	воспламеняющихся жидкостей и газов, щелочных металлов, электрооборудования	Электрооборудования
Пенные огнетушители	воспламеняющихся жидкостей, а также для тушения крупных очагов возгорания	Электрооборудования
Огнетушители на основе BCF (бромхлорфтор метана)	воспламеняющихся жидкостей, электрооборудования	

Меры на случай пожара

При возникновении пожара следует немедленно дать сигнал тревоги (включить систему тревоги, позвонить дежурному и в пожарную часть по 01). Удалить от места загорания легкогорючие жидкости и материалы. Необходимо отключить газ и электричество, закрыть двери и окна. Далее определить тип и объем пожара. Если пожар большой, выйти из помещения. Бороться только с маленьким изолированным пожаром. Определить, что горит (дерево, жидкости, газ, электрооборудование).

Если горит твердое горючее, можно использовать воду, углекислоту или сухие химические гасители. Если горит жидкость, засыпать песком, чтобы предотвратить распространение, использовать углекислоту. Не применять воду!

Если пожар связан с электричеством, немедленно выключить, водой можно пользоваться только после выключения тока, если загорелся газ, отключить источник. Во всех случаях можно использовать углекислоту.

Главное условие для предотвращения возгорания – соблюдение правил противопожарной охраны и пожарного надзора, исправность электрической и газовой сети, приборов, правильное хранение материалов.

Меры первой (доврачебной) помощи при несчастных случаях

О происшедшем несчастном случае пострадавший или ближайший свидетель обязан немедленно поставить в известность руководителя работы или начальника лаборатории, после чего пострадавший сам или в сопровождении работника лаборатории направляется в медпункт (медсанчасть). При необходимости врача медпункта вызывают на место происшествия.

При отравлениях пострадавшего необходимо немедленно вывести (вынести) из загазованной атмосферы на свежий воздух, а затем направить (отвезти) в медпункт.

При затрудненном дыхании до прихода врача следует освободить пострадавшего от стесняющей его одежды и давать ему дышать кислородом, а при необходимости тепло укрыть.

В случае потери сознания с остановкой дыхания пострадавшему нужно немедленно, не ожидая прихода медперсонала, делать искусственное дыхание.

При поражениях раздражающими газами (хлором, фосгеном, окислами азота и др.) искусственное дыхание противопоказано.

Для предупреждения отравлений при попадании на кожу ароматических амино- и нитросоединений необходимо облитый или загрязненный участок тела тщательно обмыть теплой водой, а затем обработать

2% раствором уксусной кислоты. При попадании этих веществ на спецодежду ее следует заменить чистой одеждой.

При термических ожогах обожженное место следует смочить этиловым спиртом или раствором марганцовокислого калия или положить повязку с мазью от ожогов. При тяжелых ожогах помощь должна оказываться медицинским персоналом.

Если загорелась одежда, следует сначала погасить пламя, накинув на пострадавшего шерстяное или асбестовое одеяло, или другим способом, а затем снять с него одежду и при необходимости положить его на чистую простынь, вызвав немедленно врача.

При химических ожогах необходимо прежде всего удалить с кожи вызвавшие ожог вещества соответствующим растворителем, а затем пораженный участок тела обработать спиртом.

При ожогах едкими веществами, растворимыми в воде (кислотами, щелочами) надо быстро промыть обожженное место большим количеством воды (сильной струей), а затем обработать его нейтрализующими средствами.

Одежду, облитую концентрированными кислотами, щелочами или другими едкими веществами, обязательно нейтрализуют, обезвреживают и после этого подвергают стирке.

Надевать загрязненную спецодежду запрещается.

При химических ожогах глаз кислотой или щелочью необходимо до обращения в медпункт обязательно промыть пострадавшему глаза большим количеством воды.

При засорении глаз следует обращаться в медпункт.

При поражениях электрическим током, если человек остается в соприкосновении с токоведущими частями, необходимо немедленно выключить ток при помощи пускателя либо вывернуть предохранительную пробку или перерубить токопроводящий провод изолированным инструментом (кусачки, топор с деревянной ручкой).

Если нет возможности быстро отключить электрический ток, оказывающий помощь должен изолировать свои руки диэлектрическими перчатками, встать на резиновый коврик, сухую доску, сухие тряпки (ткани) и отделить пострадавшего от токоведущих частей, к которым он прикасается. Нельзя прикасаться незащищенными руками к пострадавшему, пока он находится под током.

Если пострадавший потерял сознание, нужно немедленно, не теряя времени, не ожидая прибытия медперсонала, применить искусственное дыхание.

В каждой лаборатории необходимо иметь согласованный с медпунктом (медсанчастью) набор медицинских препаратов и перевязочных средств, для хранения которых отводят специальный шкафчик-аптечку - устанавливаемый в легко доступном месте.

Рекомендуемый состав аптечки первой помощи включает бинты, лейкопластырь, стерильные ватные и марлевые тампоны, 70% раствор этилового спирта, настойку йода, спиртовой раствор бриллиантовой зелени, 2% раствор бикарбоната натрия, 0,05% раствор перманганата калия, 1% раствор уксусной кислоты.

Нормативные документы по охране труда и технике безопасности.

1.Правила устройства, техники безопасности и производственной санитарии при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР. Утв. МЗ СССР и ЦК профсоюза медицинских работников 30 сентября 1970 г.

2.Типовая инструкция по безопасной работе в химической лаборатории на предприятиях, в учреждениях Министерства медицинской промышленности. Утв. ММП 24 октября 1969 г.

3.Правила по эксплуатации и технике безопасности при работе на автоклавах. Утв. Минздравом СССР 30 .03 . 71 г.

4.Типовые правила пожарной безопасности для больниц, клиник, поликлиник, родильных домов, диспансеров, детских яслей, домов ребенка, санаториев, домов отдыха, аптек, аптечных складов, галеновых производств и других учреждений здравоохранения. М. 1971 г.

5.ГОСТ 12. 1.004-76 «Пожарная безопасность».

6.ГОСТ12. 2. 025-76 « Изделия медицинской техники. Электробезопасность.»

7.ГОСТ 12.1.008-76 «Биологическая безопасность. Общие требования»

8.Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР. Утв. Главным государственным санитарным врачом СССР 20 октября 1981 г. № 2455-81.

9.Правила по технике безопасности и производственной санитарии при работе в химических лабораториях медицинских учебных заведений. Утв. МЗ СССР 20 декабря 1982 г.

10.ОСТ.42-21-2-85. «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения».

11.Санитарные правила обращения с радиоактивными отходами. СанПиН 3938-85.

12.Правила техники безопасности при эксплуатации изделий медицинской техники в учреждениях здравоохранения. Общие требования. Утв. МЗ СССР 27 августа 1984 г.

13.Временный классификатор токсичных промышленных отходов и методические рекомендации по определению класса токсичности промышленных отходов. Утв. МЗ СССР 13. 05. 1987г. № 4286-87.

14.Пособие по проектированию учреждений здравоохранения (к СНиП 2.08 02-89).Раздел III- Специализированные, вспомогательные подразделения и служебно-бытовые помещения. МЗ СССР, ГипроНИИздрав, 19.12.1989г.

15.Инструкция по противоэпидемическому режиму в лабораториях диагностики СПИД. Утв. Приказом МЗ СССР 5 июня 1990 г. № 42-28/38-90.

16.Инструкция по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Утв. МЗ СССР 17января 1991 г.

17.Об организации работы по охране труда в органах управления, учреждениях, организациях и предприятиях системы Министерства здравоохранения Российской Федерации. Приказ МЗ РФ № 126 от 29 апреля 1997 г.

18.Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений. СанПиН 2.1.7.728-99.

19.Laboratory biosafety. Manual second edition. Geneva, World Health Organization, 1993.