

Иммуноферментный анализ в клинических лабораториях

- Кирилл ВОРОНИН, к.б.н.,
- Любовь ЛОБОРТАС

Измерение уровней гормонов и метаболитов, оценка иммунного статуса по конкретным параметрам, диагностика инфекций вирусной и бактериальной природы и мониторинг их лечения, ургентная диагностика неотложных состояний, определение онкомаркеров – даже этот неполный перечень применений ИФА впечатляет, и в большинстве случаев альтернативы нет.

Продолжая ряд обзорных статей, посвященных основным отраслям клинической лабораторной диагностики, нельзя обойти стороной такое важнейшее ее направление, как иммуноферментный анализ (ИФА, в англоязычной литературе – ELISA).

В настоящее время ИФА прочно вошел в лабораторную практику и широко используется в различных отраслях медицины для качественного и количественного определения различных биологических соединений. Мы позволим себе в рамках этой публикации не углубляться в историю внедрения технологии ИФА в клиническую диагностику. Отметим лишь, что за более чем 40 лет своего существования ИФА в «классическом» формате 96-луночной микроплашки сумел вытеснить прочие методы иммунохимического анализа (иммуноблот, иммунорадиометрию, ручную иммунофлуоресценцию) и прочно укрепился на позициях «рабочей лошадки» в КДЛ любого профиля и масштаба.

Можно быть уверенными, что даже в лаборатории завтрашнего дня

место для ИФА найдется. Причиной тому – уникальное сочетание в методе к е специфичности собственно иммунохимического анализа и высокой чувствительности детекции ферментативной метки, обеспечивающие надежный и информативный результат исследования.

Принцип ИФА

В основе иммуноферментного анализа лежат специфичные взаимодействия антител и антигенов, называемые иммунологическими реакциями. Принцип метода довольно прост: если в тестируемом образце нужно определить антигены, то в состав тест-системы должны входить соответствующие антитела, и наоборот: реагенты для определения антител не могут не включать соответствующий антиген. К счастью, сегодня лабораториям не приходится даже задумываться об этом, поскольку на рынке доступны многочисленные коммерческие наборы тест-систем и реагентов, в которые производителями включено все необходимое для получения результата ИФА.

Разработаны многочисленные варианты иммунологических реакций. С незначительными изменениями они реализованы в тест-системах любых производителей. Не претендуя на исчерпывающий обзор, приводим лишь основные реакции.

- **«Сэндвич»:** различные модификации этого метода применяются для детекции в образце антигенов или антител. В ходе реакции искомая молекула оказывается связанной между двумя антителами, одно из которых сорбировано на твердой фазе (стенке лунки или пробирки), а другое несет на себе метку – образуется «слоистый» комплекс, который и дал название методу.
- **Конкурентный ИФА:** незаменим для измерения уровня гаптенов – малых небелковых молекул, какими являются, например, стероидные гормоны, многие антибиотики и прочие вещества и метаболиты.
- **Иммунный захват:** эта реакция применяется для высокоспецифичного определения антител IgM, поскольку позволяет избежать перекрестной



Фото 1: Автоматически промыв атель плашек ELx50

реакции с ревматоидным фактором и другими IgM — т.е. дает меньше ложно-положительных результатов.

Вторым обязательным этапом ИФА является использование ферментов на стадии мечения продукта иммунологической реакции с целью его детекции. При добавлении ферментов в реакционную смесь, содержащую субстрат, образуются окрашенные продукты реакции, количество которых пропорционально уровню искомого вещества в образце и измеряется как цветность (колориметрия) или флуоресценция (флуориметрия) конечного раствора.

Развитие методов ИФА можно сравнить с бурным прогрессом компьютерных технологий. Уже канули в Лету времена ручных постановок ИФА. Мы живем в дни, когда этот анализ стал рутинной для лаборатории, в полном смысле слова неотъемлемой составляющей ежедневной работы КДЛ. Но десятки или даже сотни постановок ИФА в день, которыми сегодня не удивишь специалистов, были бы невозможны без инструментальных решений.

Оборудование для ИФА

Стандартный комплект аппаратуры для ИФА:

- фотометр (ридер) (фото 2);
- промыватель (вошер) (фото 1);
- встряхиватель с инкубатором (шейкер-термостат);
- набор одно- и многоканальных дозаторов с одноразовыми наконечниками.

Именно такое оборудование привычно для отечественных лабораторий, поскольку является относительно недорогим и удобным решением для ИФА. Хорошо, если в комплект входит программное обеспечение, которое дает возможность сохранять и трансформировать все полученные данные, вести статистическую обработку результатов исследований, строить графики и т.п.

Это так называемые открытые системы, которые можно использовать с реагентами любых производителей — благо, стандартный 96-луночный формат микроплашек и подобие протоколов ИФА не накладывают существенных ограничений на применение.

В зависимости от бюджета укомплектовать ИФА-лабораторию минимальным набором аппаратуры откры-

того типа сегодня можно за довольно скромную стартовую сумму порядка 30 тыс. грн., отказавшись, например, от шейкера и ограничившись стриповым фотометром и минимальным количеством дозаторов. Стоимость же полных комплектов может достигать 80 тыс. грн. и более.

Говоря об устройствах для работы с микроплашками, непросто обойти вниманием ведущего мирового производителя — американскую компанию BioTek Instruments, хорошо известную отечественным специалистам. Большим преимуществом является то, что BioTek предлагает любые возможные решения и их комбинации для ИФА: простейшие одноканальные фотометры ELx800 и более функциональные 8-канальные ELx808 (фото 2), простые автоматические промыватели ELx50 и специализированные ELx405, а также комбайны, работающие в режимах измерения абсорбции, люминесценции и флуориметрии, — и это лишь малая часть списка.

Здесь следует подчеркнуть, что типичным ошибочным критерием при выборе фотометра для ИФА является скорость считывания 96-луночной микроплашки. Казалось бы, у ELx808 она сравнительно невелика: до 20 с, тогда как аналогичные модели могут работать вдвое быстрее. Однако вспомним, как обычно происходит считывание плашки: высокая скорость достигается тем, что одновременно просвечиваются все лунки и одновременно срабатывает большое количество сенсоров. Специалисты BioTek пошли другим путем: в ELx808 лунки просвечиваются поочередно, в шахматном порядке, и вся плашка обрабатывается в несколько заходов — при этом уменьшается перекрестное засвечивание соседних лунок, что гарантирует верное измерение.

Если же оценить количество микроплашек, обычно обрабатываемых лабораторией в день — а это не больше, чем несколько десятков, — то суммарная потеря времени для считывания даже 50–100 плашек составит 10–15 мин. в день. Это ли цена за качество



Фото 2: Восьмиканальный фотометр ELx808

результата?

Ридер ELx808 представляет собой также пример удачного комбинирования фотометра со встроенным шейкером-термостатом, что может освободить от необходимости комплектовать КДЛ дополнительным встряхивателем и инкубатором.

Однако не следует забывать, что инструментальных решений недостаточно — для получения надежных и воспроизводимых результатов важное значение имеет качество используемых тест-систем и правильность выполнения методики персоналом.

Тест-системы для ИФА

В пределах данной статьи, к сожалению, невозможно описать все многообразие тест-систем для ИФА, предлагаемых многочисленными производителями. Обычно все они поставляются в виде 96-луночных микропланшетов, покрытых антителами, и набора реагентов, необходимых для постановки реакции: контрольные, калибровочные, промывочные, буферные растворы, конъюгат, субстрат, стоп-реагенты и т.п. Поэтому при всем богатстве выбора следует обращать внимание не только на цену наборов, но и на их принципиальные функциональные и эксплуатационные характеристики: какие компоненты, в каком виде и объеме входят в состав набора, уровень их стабильности после приготовления, особенности протокола (сложность, температурный режим, время исполнения, необходимость в дополнительном оборудовании), качество тест-систем и т.д.

Основные характеристики качества тест-систем (наборов реагентов) для



Фото 3: Автоматический анализатор mini VIDAS

ИФА едины во всем мире и призваны отражать надежность и точность получаемого с их помощью результата: чувствительность, специфичность и воспроизводимость.

Три необходимых условия ИФА: надежное оборудование, тест-системы высокого качества и верное выполнение методики, к сожалению, на деле не всегда оказываются простыми и достижимыми.

Типичные ошибки при ИФА

По сути, открытые системы для ИФА, основой которых являются фотометр и промыватель, не реализуют в полной мере автоматизацию этой технологии, поскольку львиную долю операций лаборант продолжает делать вручную. Отсюда — зависимость результатов от человеческого фактора. Перечень характерных ошибок сможет легко продолжить любая лаборатория: неверное соблюдение временных интервалов и температурного режима реакции, несрабатывание контрольных реагентов, отсутствие контроля на всех этапах анализа, перекрестная контаминация образцов или реагентов, нехватка дистиллята, посуды и наконечников, ненадежная работа многоканальных дозаторов и т.д. Использование ручной промывки микропланшет, при попытке сэкономить на приобретении автоматического промывателя, может лишь драматично усугубить проблемы.

Существенно повысить стандартизацию всех этапов исследования могут автоматические анализаторы, о которых пойдет речь далее.

Автоматические ИФА-анализаторы

Современные автоматические анализаторы, реализующие протоколы

ИФА, принято называть закрытыми системами, поскольку они работают исключительно на расходных материалах (тест-системах), выпущенных тем же производителем, который разработал само устройство.

На самом деле назначение автоматических ИФА-анализаторов — дать лаборатории готовое решение для получения желаемого результата (будь то измерение уровня гормона или определение avidности антител). А поскольку обеспечить гарантированно надежный результат можно лишь взяв под полный контроль качество всех этапов реакции, то были созданы аппараты, которые смогли делать всю рутинную работу по ИФА автоматически. В результате лаборатория получила готовый инструмент, пользование которым максимально упрощено в силу его автоматизации, а производитель несет полную ответственность за результат анализа, при условии правильного применения системы.

Поэтому неудивительно, что все гиганты мировой индустрии лабораторной диагностики давно отказались от выпуска открытых систем и разработали закрытые автоматические комплексы. Их более высокая цена включает плату за более надежную гарантию результата! Продаются же закрытые системы, даже в Украине, все чаще, несмотря на большую стоимость, что свидетельствует о их востребованности.

Очень демонстративным примером реализации ИФА в виде полностью автоматической системы является анализатор mini VIDAS французской компании bioMérieux (фото 3). Сам анализатор представляет собой единый блок, содержащий пипетирующее устройство, инкубатор, компьютер, принтер — все необходимое. В основе работы — уникальная концепция, не имеющая аналогов: тест-системой является одноразовый пластиковый контейнер (в виде стрипа, в лунках которого уже находятся все необходимые для конкретной постановки реагенты, в нужных количествах, составах и концентрациях, прошедшие контроль качества и запечатанные фольгой) и наконечник (на внутренних стенках которого находятся антитела). Не нужны никакие дополнительные растворы и приборы! Все, что требуется сделать лаборанту, — это добавить

сыворотку в лунку стрипа, нажать кнопку «Старт», и в указанное время анализатор выдаст результат.

Наверное, жаль, что на mini VIDAS невозможно запустить любые тест-системы самых разных производителей, но его собственное меню в 100 тестов (гормоны, онкомаркеры, кардиомаркеры, инфекции) вряд ли можно считать ограниченным — каждая лаборатория, общая или специализированная, найдет в этом меню свою часть.

Первые и лучшие в мире тесты для полной ИФА-диагностики ТОРЧ-инфекций, лучшие в мире ИФА-тесты 4-го поколения для референсной диагностики ВИЧ-инфекции, уникальный маркер сепсиса прокальцитонин, специальная панель маркеров неотложных состояний — какой производитель микроплашек сможет похвастаться подобными «ограничениями»?

Следует особо подчеркнуть, что все реагенты VIDAS расфасованы по единичным дозам и в таком виде готовы к работе. Теперь лабораториям нет нужды накапливать многими днями серии образцов с целью использовать микроплашку максимально экономно. С VIDAS практически любой результат можно получить в течение часа, без дополнительных затрат и потери себестоимости анализа. С другой стороны, для mini VIDAS не важно, занят он единичными анализами или работает «на потоке» — на себестоимости исследования это не отражается, равно как и на высоком уровне стандартизации протокола и надежности результата.

Резюме

Тенденции мирового рынка клинических лабораторных исследований закономерно отображаются и в Украине. Приоритетное развитие современных высокотехнологичных автоматических ИФА-систем закрытого типа может успешно решить проблемы качества анализов, влияния человеческого фактора и поднять общий уровень лабораторной диагностики в области ИФА. Стоимость их, безусловно, выше, чем открытых систем, но гарантируемое качество результатов, экономия усилий персонала и исключение произвольных ошибок — стоят этих денег.