

Решетников С.С.

Подготовка образцов для определения концентрации общих иммуноглобулинов классов G, M, A в сыворотке крови и в других биологических жидкостях человека методом ИФА

Определение общих иммуноглобулинов классов G, M, A, а также секреторного IgA давно и прочно вошло в практику клинико-диагностических лабораторий и широко используется как для контроля иммунного статуса, так и в комплексной диагностике ряда патологий.

Для определения иммуноглобулинов в настоящее время преимущественно используют три метода: радиальную иммунодиффузию по Манчини, турбидиметрию и иммуноферментный анализ (ИФА). Каждый из этих методов имеет свои достоинства и недостатки. Так, классический метод Манчини, пожалуй, самый наглядный и простой, но и самый продолжительный (1–4 суток). Кроме того, его можно отнести к «количественным» методам (особенно по границам рабочего диапазона концентраций) только с очень большой натяжкой. Точность анализа иммуноглобулинов (особенно IgM) сильно зависит от качества агарозного геля с антителами. Например, при подсыхании геля скорость диффузии резко замедляется, а сама она развивается неравномерно, что значительно затрудняет оценку результатов исследования.

К недостаткам метода Манчини относится также визуальная оценка результатов анализа, которая может быть в высшей степени субъективна. Например, концентрация иммуноглобулинов, определенная разными операторами в одном и том же образце и с использованием наборов одной и той же серии, может различаться в 1,5–3 раза!

В более современных методах ИФА и турбидиметрии применяется инструментальный учет результатов. Эти методы позволяют проводить количественный анализ иммуноглобулинов с высокой точностью, а выбор одного или другого из них зависит в основном от оснащения лаборатории. Впрочем, ИФА благодаря более высокой чувствительности обладает очевидными преимуществами при определении низких концентраций иммуноглобулинов (например, не в сыворотке крови, а в других биологических жидкостях и средах).

ЗАО «Вектор-Бест» предлагает наборы реагентов для иммуноферментного определения концентрации общих иммуноглобулинов классов G, M, A и E, а также секреторного IgA и подклассов IgG (табл.1). Эти наборы могут быть использованы для проведения ИФА как в ручном режиме, так и на автоматических анализаторах.

Иммуноферментный метод удобен, прост и воспроизводим, однако из-за его высокой чувствительности и вследствие относительно высоких концентраций иммуноглобулинов в сыворотке крови возникают повышенные требования к качеству исследуемого образца, а также к подготовке его рабочего разведения для анализа.

Концентрации общих иммуноглобулинов в сыворотке крови и в других биологических жидкостях (БЖ) могут достигать нескольких десятков мг/мл. В то же время рабочий диапазон концентраций, измеряемый современными методами ИФА, варьирует для разных аналитов от нескольких мкг/мл до нг/мл. Иными словами, для определения концентрации иммуноглобулинов в таких образцах БЖ их необходимо развести в тысячи раз! В первую очередь это относится к общему IgG, концентрация которого особен-

Наборы реагентов ЗАО «Вектор-Бест» для иммуноферментного определения общих иммуноглобулинов

Номер по каталогу	Название набора	Назначение	Характеристики		
			Чувствительность, мкг/мл	Диапазон измерений, мг/мл	Число определений
A-8660	IgE общий-ИФА-БЕСТ	Определение общего иммуноглобулина Е в сыворотке (плазме) крови и амниотической жидкости человека	2,5*	0–960*	12×8
A-8662	IgG общий-ИФА-БЕСТ	Определение общего иммуноглобулина G в сыворотке крови и других биологических жидкостях человека	0,2	0–24	12×8
A-8664	IgM общий-ИФА-БЕСТ	Определение общего иммуноглобулина M в сыворотке крови и других биологических жидкостях человека	0,032	0–3,2	12×8
A-8666	IgA общий-ИФА-БЕСТ	Определение общего иммуноглобулина A в сыворотке крови и других биологических жидкостях человека	0,021	0–4,2	12×8
A-8668	IgA секреторный-ИФА-Бест	Определение общего секреторного иммуноглобулина A в сыворотке крови и других биологических жидкостях человека	0,35	0–20	12×8
A-8672	Подклассы IgG-ИФА-БЕСТ	Определение общих IgG ₁ , IgG ₂ , IgG ₃ и IgG ₄ в сыворотке крови и других биологических жидкостях человека	IgG ₁ – 0,18; IgG ₂ – 0,12; IgG ₃ – 0,03; IgG ₄ – 0,02	IgG ₁ : 0–18; IgG ₂ : 0–12,4; IgG ₃ : 0–2,8; IgG ₄ : 0–2;	24×8
A-8674	Иммуноскрин-Г, М, А-БЕСТ	Определение общих IgG, IgM, IgA в сыворотке крови и других биологических жидкостях человека	IgG – 0,2; IgM – 0,032; IgA – 0,021	IgG: 0–21,7; IgM: 0–2,34; IgA: 0–4,2	32×3

* МЕ/мл

но высока в сыворотке крови. Однако с увеличением степени разведения исходного образца при его подготовке для ИФА существенно возрастает вероятность ошибок. Во время этой процедуры требуются максимальное внимание, аккуратность и строгое следование инструкции.

Хранение образцов для анализа

Для определения концентрации общих иммуноглобулинов обычно могут быть использованы как свежие образцы БЖ (после соответствующей первичной обработки, если она предусмотрена), так и образцы после хранения в холодильнике при температуре от +2 до +10°C или в морозильной камере при температуре -20°C. Образцы БЖ допускается хранить в холодильнике не более одной недели, а в морозильной камере – не более 1 года при условии, что они не подвергаются повторно процедуре замораживания/размораживания. Более детально условия хранения и предобработки образцов БЖ для анализа описаны в инструкциях к соответствующим наборам реагентов.

Пробирка с образцом БЖ должна храниться вертикально и закрываться герметично. При хранении пробирки на боку или в перевернутом состоянии часть раствора может вытечь или потеряться в результате испарения на кромке крышки.

Объем сосуда для хранения не должен превышать объем образца более чем в 3 раза. Чем больше свободный объем сосуда, тем активнее происходит испарение жидкости. При недостаточно герметичной крышке жидкость в пробирке постепенно испаряется, а концентрация аналита в образце возрастает (даже в морозильной камере!). В герметичном сосуде пары жидкости обычно конденсируются на стенках и крышке сосуда в виде капель (в холодильнике) или инея (в морозильной камере). Если этот конденсат не вернуть в образец перед проведением исследования, результаты определения аналита в образце будут завышены. С другой стороны, при очень большом свободном объеме сосуда из паров воды, которые присутство-

вали в воздухе в момент закрывания крышки сосуда, может образоваться дополнительный конденсат. Эта часть конденсата при возвращении в раствор может увеличить первоначальный объем образца и снизить концентрацию измеряемого аналита.

Таким образом, для хранения образцов БЖ следует использовать только герметично закрывающуюся посуду минимального объема. Для того, чтобы быть уверенным, что концентрация аналита в образце при хранении не изменилась, полезно записывать его исходный объем на флаконе/пробирке с БЖ или в специальном журнале и (после возвращения конденсата в основной раствор) контролировать объем образца непосредственно перед анализом.

Чрезвычайно трудно учесть все факторы, влияющие на изменение БЖ в образце в процессе хранения, поэтому, если есть возможность, лучше всегда анализировать свежие образцы!

Подготовка образцов для анализа

1. Пробирку с анализируемым образцом вынуть из холодильника, встряхнуть или центрифугировать, чтобы капли конденсата со стенок и крышки пробирки смешались с основной частью объема образца. Если образец был заморожен, то его (не открывая!) нужно предварительно разморозить при комнатной температуре. Пробирку с полученным раствором следует энергично встряхнуть или центрифугировать для объединения капель конденсата с основным объемом образца.

2. Если образец выглядит однородным, не содержит видимых примесей и не имеет постороннего неприятного запаха, то его можно считать пригодным для анализа без дополнительной обработки. При наличии несвойственного данной БЖ запаха, который обычно является следствием бактериальной либо грибковой контаминации, образец бракуют и утилизируют. Мутный или содержащий видимый осадок образец подвергают очистке центрифугированием или фильтрацией, например, через шприцевой одноразовый фильтр.

3. В результате длительного хранения или после процедуры замораживания/размораживания в образцах сыворотки (и особенно плазмы) крови с высоким содержанием липидов, жиров и фибриногена может образовываться желеобразный сгусток (гель), который не удаляется центрифугированием. Если этот гель составляет не более 1/3 объема образца, а повторный забор пробы затруднителен, можно попытаться отделить жидкую фазу образца от геля и использовать ее для анализа. Иногда удалить гель из образца удастся механическим путем, например, подцепив гель кончиком наконечника для пипеток. Можно попытаться перенести пипеткой БЖ без геля в другую пробирку. Если от геля избавиться не удастся, то образец бракуют.

4. Перед анализом образец следует довести до комнатной температуры и хорошо перемешать на вортексе или пипетированием, по возможности не допуская образования пены. Качество перемешивания имеет особенно важное значение для размороженных образцов, так как в них образуется градиент плотности раствора и, следовательно, градиент концентрации иммуноглобулинов. Применяемый для пипетирования наконечник не используют затем для отбора аликвоты, а сбрасывают в дезраствор.

5. Пена в образце может серьезно искажать результаты анализа по следующим причинам:

а) растворы БЖ при наличии пены быстрее высыхают и концентрация аналита в них возрастает;

б) концентрация аналита в самой пене обычно тоже выше, чем в основной части раствора;

в) белки в пене могут быстрее денатурировать, агрегировать, распадаться на субъединицы или процессировать, изменяя при этом свои иммунохимические свойства;

г) попадание пены в наконечник пипетки занижает результаты анализа, поскольку в наконечнике остается меньше места для образца;

д) пена, прилипшая к внешней стенке наконечника пипетки, может зависеть результат

анализа, поскольку при пипетировании с этой пеной в раствор может попасть дополнительное количество аналита;

е) при вспенивании и при разрушении пены образуются аэрозоли, которые могут контаминировать другие исследуемые образцы и окружающую среду.

Для минимизации потенциальных искажений результатов анализа рекомендуется использовать указанные ниже приемы работы с пипеткой.

Техника пипетирования при подготовке рабочих разведений образцов БЖ для анализа

1. Перед началом работы автоматические пипетки (дозаторы), образцы БЖ и раствор для разведения образца (РРО) доведите до комнатной температуры.

2. Используйте только оригинальные наконечники, применяйте фильтры для дозаторов и наконечники с фильтрами.

3. При надевании наконечника на пипетку, а также в процессе работы не прикасайтесь к рабочей поверхности наконечника руками или посторонними предметами.

4. Пипетируйте растворы плавно, не допуская образования пены.

5. Во время набора жидкости держите пипетку вертикально или под углом не более 15° от вертикали.

6. При наборе жидкости погружайте наконечник в БЖ или ее разведенный раствор на глубину не более 2 мм.

7. Если в образце имеется пена, старайтесь не погружать в нее наконечник пипетки.

8. После набора раствора снимайте с наконечника остаток жидкости и/или пену, слегка прижимая его на 1–2 сек к стенке сосуда выше уровня жидкости под углом $20\text{--}45^\circ$.

9. Перед набором образца БЖ или ее разведенного раствора смочите наконечник пипетки 3–5 раз раствором для разведения образца (РРО),

затем снимите его остатки с наконечника, коснувшись стенки сосуда выше уровня РРО.

10. При наборе вязких образцов выдерживайте наконечник, погруженный в БЖ, 2–4 сек (время, достаточное для отбора пробы) и следите, чтобы в наконечник не попал пузырек воздуха или пена. После отбора образца слегка прижмите наконечник пипетки на 2–4 сек к стенке сосуда выше уровня БЖ для того, чтобы снять с наконечника избыток образца.

11. При подготовке рабочих разведений для анализа вносите БЖ по стенке сосуда, прикасаясь к ней наконечником под углом 20–45° в месте соприкосновения с РРО (при этом не следует погружать наконечник в жидкость более чем на 1,5 мм!). Вносите образец плавно, без дожима и последующего пипетирования. После внесения образца сбрасывайте наконечник и не используйте его для перемешивания. Полученный раствор объемом 0,5–10 мл перемешайте на вортексе, менее 0,5 мл – пипетированием с использованием чистого наконечника. Если разведение осуществляется в лунках дополнительного планшета, то раствор можно перемешать 10–30-кратным (в зависимости от вязкости раствора) пипетированием. При этом объем, забираемый пипеткой однократно, должен составлять не менее 1/10–1/30 объема перемешиваемого раствора. Пипетирование особенно рекомендуется для перемешивания растворов с повышенной вязкостью. Методика перемешивания обычно оговаривается в инструкции к набору реагентов. Иногда применяют комбинированное перемешивание, когда одновременно перемешивают и пипетированием, и вращением наконечника, как ложкой в стакане. При перемешивании вращением наконечник пипетки не следует плотно прижимать ко дну и стенкам лунки планшета.

12. Наконечник, использованный для перемешивания или пипетирования БЖ, нельзя применять для приготовления растворов с меньшей концентрацией аналита.

13. Если предполагается многоступенчатое разведение, то пробу для каждого последующего

разведения следует отбирать новым чистым наконечником, а само разведение осуществлять так, как описано выше.

14. При внесении подготовленных образцов в лунки планшета для анализа следует соблюдать технику пипетирования, изложенную в п.п. 1–8, образец вносить в лунку планшета плавно по ее стенке (если в лунке имеется рабочий буферный раствор, после касания наконечником его поверхности).

Требования к автоматическим пипеткам, наконечникам, мерной посуде

- Пипетки должны своевременно проходить техническое обслуживание и поверку.

- Для получения адекватных результатов и продления срока службы пипетки ее следует использовать только с оригинальными или идентичными оригинальным наконечниками.

- Во избежание контаминации биологическим материалом и химическими реагентами рекомендуется использовать одноразовые наконечники с фильтрами (а сами пипетки регулярно очищать, подвергать санитарной обработке и также оснащать сменными фильтрами).

- Для хранения наконечников рекомендуется использовать специальные закрытые штативы с крышками.

- Не следует прикасаться руками к рабочей части наконечника пипетки, не следует прикасаться наконечником пипетки к внешним стенкам посуды и к другим предметам.

- Пипетки, наконечники, мерная посуда перед работой должны быть доведены до комнатной температуры.

Заключение

Как уже упоминалось выше, наибольшее количество ошибок возникает при определении концентрации IgG. В самом начале работы с соответствующими наборами такие ошибки чаще всего выражаются в массовом выявлении у пациентов аномально высоких значений этого иммуногло-

булина, особенно в сыворотке или плазме крови, и в плохой воспроизводимости анализа. Возможно, это объясняется тем, что врачи-лаборанты, как правило, привыкли иметь дело со специфическими иммуноглобулинами, концентрация которых в БЖ по сравнению с общими иммуноглобулинами меньше в сотни и тысячи раз! В ИФА для определения специфических иммуноглобулинов образцы БЖ обычно используются без разведения или же разводятся однократно. При переходе к высоким степеням разведения БЖ даже у опытных операторов на результатах анализа начинает все более и более сказываться эффект суммирования мелких, казалось бы, совершенно незначительных погрешностей и недочетов.

Строгое соблюдение описанных здесь принципов хранения, подготовки и разведения БЖ для анализа позволит избежать типичных ошибок при количественном определении общих иммуноглобулинов методом ИФА. Это гарантирует правильные и воспроизводимые результаты, вопросы и претензии отпадают, и потребители по достоинству начинают ценить преимущества метода ИФА (например, в сравнении с методом радиальной иммунодиффузии по Манчини).

**Предлагаем наборы реагентов
для иммуноферментной
и real-time ПЦР-диагностики**

*ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов А, В, С, D,
Е, G; TORCH-инфекций; инфекций, передаваемых
половым путем; паразитарных и желудочно-
кишечных заболеваний; клещевых инфекций,
аутоиммунных и системных заболеваний;
беременности и ее мониторинга; выявления
опухолевых маркеров, гормонов и цитокинов;
а также*

наборы реагентов для клинической биохимии.

*Максимальный выбор
диагностической продукции!*

ЗАО «Вектор-Бест»

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492
Тел.: (383) 332-37-58, 332-36-34
Тел./факс: 332-67-49, 332-67-52
e-mail: vbmarket@vector-best.ru
Internet: <http://www.vector-best.ru>

Представительства:

Москва:	(495) 710-76-96
С.-Петербург:	(812) 495-55-99
Ростов-на-Дону:	(863) 295-15-61
Уфа:	(347) 246-23-34
Екатеринбург:	(343) 372-90-50
Хабаровск:	(4212) 335-946
Нижний Новгород:	(831) 270-48-53
Киев:	(044) 220-04-04

Формат 80×100/32. Гарнитура Century SchoolBook.
Подписано в печать 05.03.13. Тираж 3000 экз.

Отдел оперативной печати ЗАО «Вектор-Бест».
630559, Новосибирская обл., пгт. Кольцово, а/я 121.
