

# Обеспечение качества иммуноферментного анализа.

# ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ

## КАЧЕСТВА ИФА

- Исправное оборудование.
- Достаточная (высокая) квалификация персонала.
- Соблюдение правил при подготовке исследуемых образцов.
- Правильный выбор тест-систем, соблюдение условий их доставки и хранения.
- Соблюдение правил при подготовке и постановке ИФА.
- Правильный учет и интерпретация результатов.
- Внешний и внутрилабораторный контроль качества .

# Средства измерения, подлежащие метрологической поверке

- **Спектрофотометр** (набором эталонных фильтров с различной оптической плотностью).
- **Пипетки** (гравиметрическим способом, взвешивая дистиллированную воду 10%, 50%, 100% от полного объема шкалы пипетки).
- **Термометры** (относительно эталонного термометра).

# КОНТРОЛЬ РАБОТЫ ПЛАНШЕТНОГО СПЕКТРОФОТОМЕТРА

- Смешать 1:1 дистиллированную воду и 1М серную кислоту;
- Разлить по 200 мкл во все лунки планшета (планшет предварительно должен быть промыт р-ром ФСБ-Т);
- Измерить оптическую плотность на 450 нм относительно воздуха;
- ОП не должна превышать 0,05.

## КОНТРОЛЬ РАБОТЫ АВТОМАТИЧЕСКИХ ПИПЕТОК

*Необходимы метрологическим путем поверенные весы и разновесы.*

- Выставить пипетку на объём 50 % от полного объёма шкалы пипетки (или наиболее часто используемый объём).
- Отобрать соответствующее количество дистиллированной воды.
- Вылить воду в сухую, предварительно взвешенную, пробирку и сделать повторное взвешивание.

**1 мкл – 1 мг**

# ТЕРМОСТАТ

- Необходимо в термостате на полке иметь термометр (поверенный).
- В термостатах без вентилирования температура в разных зонах камеры может существенно различаться.
- В современных термостатах, как правило, есть вентилятор создающий равномерность температуры по всему объему.

# АВТОМАТИЧЕСКИЕ ВОШЕРЫ И РУЧНЫЕ ГРЕБЁНКИ

- Необходимо следить за состоянием каналов; их засорение приводит к снижению эффективности отмывки.

*Требуется ежедневная промывка системы дистиллированной водой (не оставляйте вошер заполненным промывочным раствором на ночь).*

- Наличие микробиологических заростов в шлангах, каналах, ёмкостях уменьшает специфичность анализа.

*Обязательно, как минимум, раз в неделю промывать всю систему вошера 70% спиртом или другим раствором, рекомендованным инструкцией к прибору.*

# ДИСТИЛЛЯТОР

- Правильная настройка дистиллятора, обеспечивающая требуемое качество дистиллированной воды: удельная проводимость при 20 °С — не более 0,0005 см/м, рН 5,0-7,0.
- Периодическая профилактическая чистка дистиллятора.
- Стерилизация шлангов и бутылей (автоклавирование, прожаривание в сухожаре) с целью исключения контаминации воды.

# ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

## **Сыворотка крови**

- Завершённое формирование фибринового сгустка (фибрин – источник ложноположительных результатов)
- Исключить возможность контаминации одного образца другим (использование индивидуальных стеклянных палочек или наконечников для обведения сгустка).
- Возможен частичный гемолиз, но не допускается клеточная взвесь (видно по преципитации эритроцитов в лунках планшета).
- Сыворотки должны быть без проростов, при длительном хранении (более 3 дней) лучше заморозить.

## **Плазма**

- Должна быть свободна от тромбоцитов.

# Правила дезинфекции в лаборатории

**Исследуемые и контрольные образцы - потенциально инфекционный материал!**

- Работать в резиновых перчатках и медицинских масок.
- Оставшиеся исследуемые образцы, посуду и наконечники, с ними контактировавшие, замачивать в 6% перекиси водорода.
- Посуда и наконечники, не контактировавшие с образцами, не требуют дезинфекции.
- Поверхность стола, пипетки, перчатки в процессе работы дезинфицировать только 70% спиртом. Категорически запрещается использовать для этого растворы перекиси водорода, хлорамина или гипохлорита натрия.

# Работа с наконечниками для автоматических пипеток

- Желательно одноразовое использование наконечников, особенно используемых для работы с конъюгатом и субстратным раствором.
- В случае невозможности одноразового использования наконечники для сывороток, конъюгата и субстратного раствора должны быть разделены. Замачивание для инактивации в перекиси водорода только наконечников, используемых для дозирования сывороток.
- Для конъюгата и субстратного раствора в одной тест-системе можно несколько раз использовать наконечники. В этом случае после использования ополоснуть их в дист. воде, 70% спирте и сложить в подписанную (название тест-системы, «конъюгат» или «ТМБ») чашку Петри.

# Методика мытья

## наконечников

- Замачивание в 6% перекиси водорода, можно с 0,5% жидкого моющего средства на 24 часа

*категорически запрещается использование моющих средств с биологически активными веществами и СМС в виде любых стиральных порошков!*

- промывка 10 раз холодной водой
- промывка 2 раза дистиллированной водой
- кипячение в третьей порции дистиллированной воды не менее 30 минут
- сухожар 80° С не менее 5 – 6 часов до полного высыхания или поместить в 70% спирт не менее чем на 2 часа, а затем высушить при комнатной температуре на воздухе
- раскладка наконечников в штативы пинцетом!

# ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

- Внимательно изучить инструкцию по применению тест-системы.
- Не использовать тест-системы с истекшим сроком годности.
- Не смешивать реактивы из разных серий наборов.
- Компоненты набора перед началом ИФА должны быть прогреты до комнатной температуры.
- Разборный планшет перед вскрытием необходимо выдержать при комнатной температуре не менее 30 мин для предотвращения конденсации влаги.
- Кристаллы в концентрате отмывающего буфера должны быть растворены.

# ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

- Сухие компоненты набора должны быть восстановлены заранее и выдержаны не менее 15 мин до использования.
- Неиспользованные стрипы должны быть немедленно упакованы и тщательно запечатаны в пакет для планшета с влагопоглотителем.
- Необходимо следить за состоянием влажной камеры – исключить бактериальные заросты (желательно камеру готовить ежедневно); влажная камера должна быть предварительно прогрета до температуры инкубации.

# ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ

**Строгое выполнение  
условий проведения ИФА,  
указанных в инструкции!**

# ВНЕСЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Контролировать качество вносимых исследуемых образцов (отсутствие сгустков, клеточных элементов крови, прозрачность).
- При внесении образца в разводящий раствор – тщательное перемешивание пипетированием.
- Исключить манипуляции с образцами над рабочим планшетом.
- Продолжительность внесения образцов в лунки должна составлять не более 20-30% от времени инкубации.

# ВНЕСЕНИЕ КОНЪЮГАТА

- Использовать одноразовую посуду и наконечники.
- При повторном использовании – отдельно выделенные наконечники и посуда, которые не обрабатывать дезинфицирующими и моющими средствами.
- При одновременной инкубации сыворотки и конъюгата – раствор конъюгата вносить, не касаясь наконечниками сывороточного раствора.

# ИНКУБАЦИЯ

- Контроль температуры в термостате (по дополнительному термометру).
- Предварительный прогрев влажной камеры (если она используется).
- Тщательное заклеивание планшета клейкой плёнкой, предотвращающее испарение жидкости.
- Размещение планшетов в один слой.
- Строгое соблюдение продолжительности инкубации.

# ПРОМЫВКА ПЛАНШЕТА

- Соответствие состояния промывающих устройств требованиям: равномерность внесения-удаления промывочного раствора, чистота ёмкостей и шлангов.
- Полное заполнение лунок промывочным раствором и полное его удаление в каждом цикле промывки.
- Время экспозиции промывочного раствора в лунке при каждом цикле промывки должно быть не менее 10 сек (если не оговорено по-другому в инструкции).
- Тщательное удаление влаги из лунок после промывки.
- Не допускать подсыхания лунок между операциями.
- Смена фильтровальной бумаги на разных стадиях постановки ИФА.

# ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ВНЕСЕНИЕ РАСТВОРА ХРОМОГЕНА

- Использовать одноразовую посуду и наконечники.
- При повторном использовании – отдельные наконечники и посуда, которые не обрабатывать дезинфицирующими и моющими средствами.
- Категорически недопустимо перекрёстное использование посуды и наконечников для работы с разными хромогенами.
- Исключить воздействие прямого солнечного света.

# ИНКУБАЦИЯ С РАСТВОРОМ

## ХРОМОГЕНА

- Исключить воздействие света.
- Соответствие температуры инкубации требованиям (18-25°C).
- Строгое соблюдение продолжительности инкубации.
- Визуальный контроль характера окрашивания раствора в лунках (неравномерное окрашивание, появление окрашенных капель на стенках лунок – результат некачественной работы).

# ОСТАНОВКА РЕАКЦИИ

**При внесении стоп-реагента необходимо добиваться полного перемешивания растворов  
(не пипетированием)**

# УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Исправный, поверенный спектрофотометр.
- Предварительный прогрев прибора.
- Сопоставить визуальную оценку планшета с распечаткой.
- Причиной повышенной ОП могут быть: загрязнение дна лунки, дефект пластика, посторонние включения в растворе, загрязнение линзы спектрофотометра.
- Исключить влияние артефактов позволяет измерение ОП относительно фильтра 620 нм

# ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

- Оценить соответствие полученных контрольных значений ОП требованиям, заложенным в инструкции по применению (валидность теста).
- Сопоставить полученные контрольные значения ОП с паспортными (при правильно проведённом анализе не должно быть существенных отличий).

## **ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ТЕСТ-СИСТЕМЫ**

При определении антигена  
- минимальная  
концентрация вещества,  
определяемая данной тест-  
системой. При  
определении антител –  
процент образцов, давших  
положительный результат  
в данной тест-системе, от  
общего количества  
обследованных образцов,  
содержащих выявляемые  
антитела.

## **СПЕЦИФИЧНОСТЬ ТЕСТ-СИСТЕМЫ**

Процент образцов, давших  
отрицательный результат в  
данной тест-системе, от  
общего количества  
обследованных образцов,  
действительно не  
содержащих выявляемый  
маркер.

# Возможные причины занижения

## чувствительности анализа

- Уменьшение времени инкубации (как правило, субстратной реакции).
- Использование загрязнённой посуды и наконечников.
- Замачивание посуды и наконечников в перекиси водорода или хлорсодержащих растворах без последующего кипячения в процессе мытья.
- Обработка рабочих поверхностей, пипеток, перчаток в процессе работы перекисью водорода или хлорсодержащими растворами.
- Плохая отмывка после инкубации сывороток в тестах, выявляющих антитела.
- Растворы, не нагретые перед постановкой до комнатной температуры.
- Размещение планшетов в термостате стопкой.
- Низкая температура в лабораторных комнатах.
- Нарушение правил и сроков хранения вскрытых компонентов при детальном использовании набора.

# Возможные причины снижения специфичности анализа

- Контаминированный вошер или низкого качества дистиллированная вода.
- Плохая отмывка на стадии конъюгата.
- Длительное внесение образцов по отношению к времени инкубации.
- Неправильная работа с пипетками (контаминация пипетки, неправильное дозирование).
- Неправильное использование влажной камеры, липкой пленки, приводящее к подсыханию раствора.
- Многократное использование наконечников и посуды для субстратного раствора (ТМБ).
- Нерастворенные кристаллы в концентрате отмывающего раствора.
- Заросшие или с наличием клеточных элементов сыворотки.
- Неисправный планшетный спектрофотометр.

# Список литературы использованной при подготовке презентации

1. «Медицинские лабораторные технологии» Справочник., Санкт-Петербург 1999г., А.И. Карпищенко;
2. «Справочник практического врача» Москва 2000г., А.И. Воробьев;