

УДК 616-71

О. Б. Кострова, И. Б. Ландау, Н. М. Сафьянников

Комплекс метрологического обеспечения иммуноферментных и биохимических анализаторов

Ключевые слова: иммуноферментные и биохимические анализаторы, достоверность диагностики, метрологическое обеспечение, контроль качества, средства поверки.

Keywords: biochemical analyzers, analyzers for enzyme immunoassay, diagnostic reliability, metrological support, quality control, calibration tools.

В связи с высокой диагностической значимостью результатов, получаемых медицинскими фотометрическими анализаторами, чрезвычайно важным является повышение достоверности проводимых исследований. В статье рассматривается средство на основе твердотельной имитации жидких проб, позволяющее проводить систематический контроль работоспособности иммуноферментных и биохимических анализаторов на рабочих местах в процессе эксплуатации и государственную метрологическую поверку.

Получение информации о биологических объектах техническими средствами составляет предмет исследований и разработок в области биомедицинской инженерии.

Последние 60 лет активно развиваются инструментальные методы в сфере медицинских лабораторных технологий, в том числе при исследовании биопроб *in vitro*. Медицина стала использовать информацию, получаемую технико-биологическим путем, что привело к созданию специального класса измерительных приборов — средств измерения медицинского назначения (СИМН).

Постановка и широкое внедрение в медицинскую практику биохимических исследований (а последние 20 лет — иммуноферментных исследований) привело к появлению в составе СИМН биохимических и иммуноферментных анализаторов. Эти приборы осуществляют фотометрический анализ, основанный на зависимости концентрации или количества вещества в исследуемой пробе от поглощения исследуемой средой оптической энергии в определенном диапазоне электромагнитных колебаний [1].

Биохимические (и особенно иммуноферментные) анализаторы планшетного типа активно применяются в различных областях медицины: вирусологии, бактериологии, иммунологии, эндокринологии,

гинекологии, акушерстве и гинекологии, онкологии, токсикологии, аллергологии. Следует отметить, что во многих случаях достоверность иммуноферментного анализа (ИФА) имеет определяющее значение, например, при диагностике таких особо опасных заболеваний, как СПИД, гепатит, наркомания и т. п.

Высокая диагностическая значимость лабораторного анализа, широко применяемого в медицинской практике для диагностики и прогнозирования заболеваний, а также для оценки эффективности терапии, поставила задачу повышения достоверности результатов, получаемых с помощью технических средств.

Применение СИМН в медицинской практике требует регистрации в Минздраве с выдачей соответствующего регистрационного удостоверения и регистрации в Реестре средств измерений РФ с выдачей свидетельства об утверждении типа средства измерения.

Однако наличие разрешительных документов, контроль в процессе производства, метрологическая поверка и послегарантийное обслуживание не снимают проблем текущего контроля качества иммуноферментных и биохимических анализаторов, так как всевозможные отклонения параметров и характеристик приборов могут возникать в периоды между поверками и регламентными работами [2]. Именно поэтому вопрос контроля качества исследований, проводимых в лабораториях иммуноферментного анализа, стоит так остро. В настоящее время контроль качества реализуется двумя путями:

- с использованием в качестве контрольных элементов биохимических средств (жидких проб);
- с использованием в качестве контрольных элементов технических средств (твердотельных образцов).

Биологические образцы (типовые контрольные панели сывороток) применяются в практическом здравоохранении для внешнего контроля качества лабораторной диагностики. Эти технологии раз-

виваются у нас в стране с 1990-х годов и предназначены, прежде всего, для интегральной оценки контроля качества ИФА.

Метод контроля качества с применением биохимических образцов (контрольных сывороток) имеет ряд существенных недостатков. Во-первых, в настоящее время отсутствует достаточная номенклатура контрольных сывороток, которая позволила бы контролировать проведение диагностики большого ряда заболеваний. Во-вторых, контрольные сыворотки — это средства однократного действия и стоимость сывороток, необходимых для регулярного (вплоть до ежедневного) контроля, слишком высока для лабораторий среднего уровня.

Кроме того, метод контроля с использованием контрольных сывороток не содержит в явном виде показателей качества средств измерения ИФА, работоспособность которых существенно влияет на результаты лабораторной диагностики как при проведении иммуноферментных исследований, так и при обработке типовых контрольных панелей сывороток.

Именно поэтому, столь очевидна необходимость организации в процессе эксплуатации внутрилабораторного контроля качества фотометрических иммуноферментных анализаторов. Иными словами: для повышения качества лабораторной диагностики методом ИФА целесообразно наряду с системой внешнего контроля по интегральным показателям [3] внедрить систему контроля работоспособности непосредственно иммуноферментных анализаторов путем оперативной оценки их параметров с использованием не биологических, а технических средств. В связи с этим нами впервые в мире было предложено средство медицинского метрологического обеспечения КПА-01 для контроля иммуноферментных анализаторов на основе прецизионной дискретной твердотельной имитации жидких проб, позволяющее создавать произвольные модели размещения проб в планшете с необходимой топологией оптической плотности по его площади. В состав средства метрологического обеспечения входят комплект нейтральных светофильтров и конструктивные элементы, обеспечивающие их прецизионную установку с возможностью изменения топологии [4].

Конструктивные элементы, имитирующие стандартные полистирольные планшеты, применяемые в лабораторной диагностике, показаны на рис. 1.

Предложенное средство, тестирующее иммуноферментные анализаторы по наиболее важным техническим параметрам, функционально и конструктивно недостаточно полное для обеспечения необходимой тщательности контроля и охвата всего парка иммуноферментных анализаторов, находящихся в эксплуатации.

Цель дальнейшего развития средства — создание универсального средства с расширенными функциональными возможностями, позволяющего



Рис. 1 | Установочные элементы для иммуноферментных планшетных анализаторов

выявлять отказы иммуноферментных анализаторов на ранней стадии.

Исследования и разработки продолжились в нескольких направлениях:

1) создание конструкции универсальных установочных элементов контрольного средства для обеспечения его совместимости с любыми иммуноферментными анализаторами, что позволит без дополнительных затрат одним средством контролировать работоспособность всех иммуноферментных анализаторов, имеющих в конкретном медицинском учреждении;

2) реализация контроля состояния спектральной характеристики, непосредственно влияющей на достоверность результатов иммуноферментного анализа, путем разработки методики проверки с помощью селективно поглощающих контрольных элементов;

3) увеличение степени представительности тестовых измерений, т. е. качества имитации тестирующим средством условий измерения, имеющих место при работе с планшетами, заполненными жидкими пробами;

4) расширение области применения средства на фотометрические медицинские анализаторы с горизонтальным ходом луча (биохимические анализаторы).

Работа в направлении повышения качества имитации позволила создать усовершенствованный вариант контрольных элементов в виде линз, обеспечивающих такой режим тестирования анализаторов, при котором измерительные световые потоки формируются идентично световым потокам в жидких пробах не только по спектральному составу и интенсивности, как в предыдущем варианте, но и по форме (рис. 2). Полученный результат защищен патентом [5].

Для решения задачи контроля биохимических анализаторов с горизонтальным ходом луча был проведен анализ технических характеристик биохимических анализаторов, применяемых в медицинской практике [1, 6], который показал, что диапазон оптической плотности и рабочий спек-

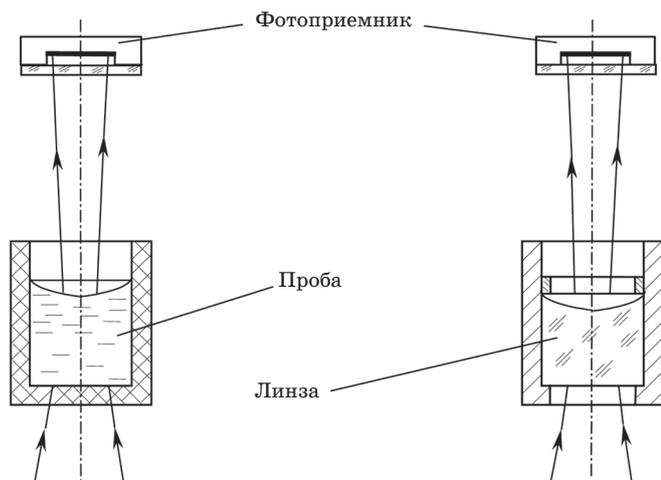


Рис. 2 Прохождение светового потока через жидкую пробу и контрольный элемент

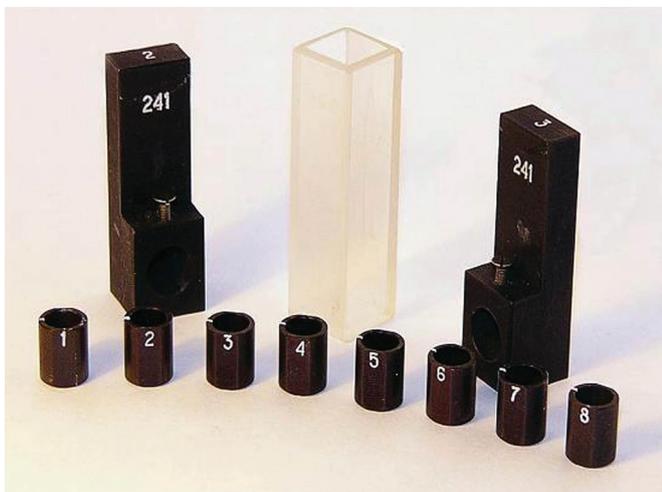


Рис. 3 Установочные элементы для биохимических анализаторов с прямоугольной кюветой



Рис. 4 Установочные элементы для биохимических анализаторов с цилиндрической кюветой

тральный диапазон контрольных элементов (светофильтров) из состава КПА-01 совместимы с параметрами многих биохимических анализаторов, что делает возможным их использование для контроля этих анализаторов. Для размещения контрольных светофильтров в биохимических анализаторах разработаны и введены в состав КПА-01 дополнительные установочные элементы, учитывающие конструктивные особенности кюветных отделений (рис. 3 и 4).

Специализированные держатели позволяют применять светофильтры для тестирования биохимических анализаторов, использующих в качестве носителей проб:

- стандартные прямоугольные кюветы с рабочей длиной хода луча 10 мм и габаритными размерами 12,5 × 12,5 × 45 мм;

- цилиндрические кюветы (пробирки) диаметром 11 мм и длиной не более 80 мм.

Необходимо отметить, что важнейшей характеристикой иммуноферментных анализаторов является линейность измерительного тракта, поскольку в лабораторных исследованиях в большинстве случаев используются методы расчетов по градуировочным характеристикам, а не по абсолютному значению оптической плотности. Именно поэтому еще одним направлением наших работ в области контроля качества ИФА стала разработка простого в применении, надежного, экономически доступного и в то же время прецизионного метода и средства контроля линейности.

Линейность измерительного тракта анализатора характеризуется отклонением ΔR реальной градуировочной характеристики 2 от идеальной 1 и определяет точность иммуноферментных исследований (рис. 5).

Были разработаны метод и средство контроля линейности принцип действия которого заключается в том, что в процессе проверки линейности для градуировки тестируемого анализатора использу-

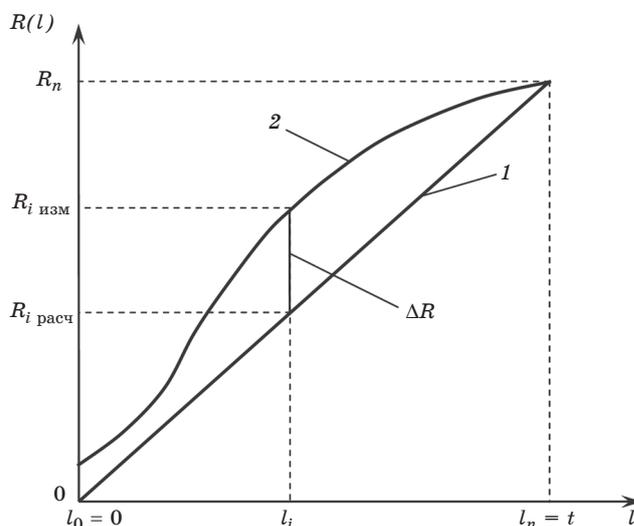


Рис. 5 Определение линейности измерительного тракта

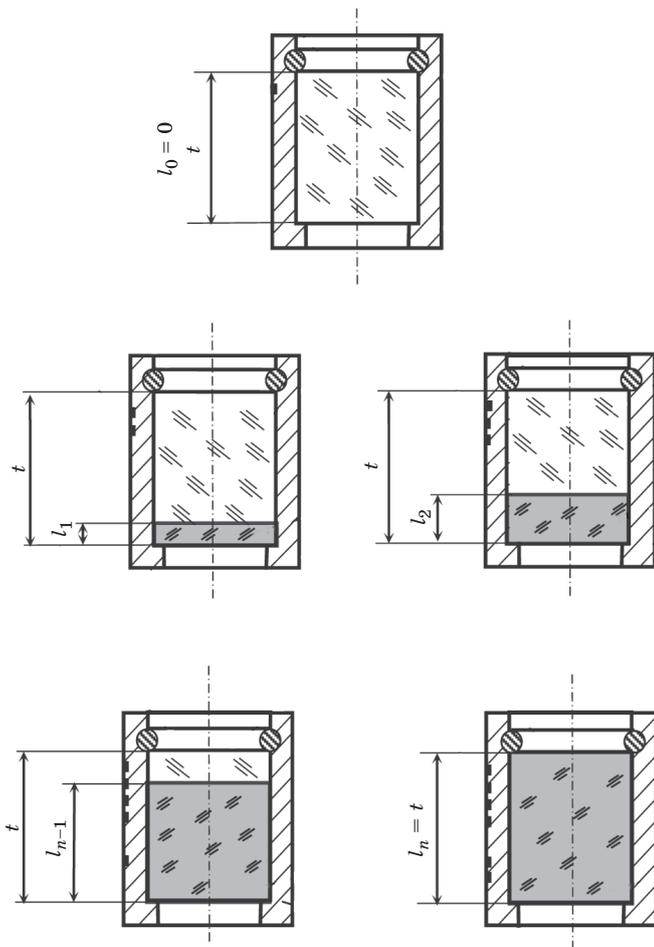


Рис. 6 Принципиальная конструкция средства контроля линейности

ются значения толщины поглощающей части введенных оптических элементов от $l_0 = 0$ до $l_n = t$. Значения толщины могут быть получены с необходимой точностью путем измерения на рабочих средствах измерения, не прибегая к измерениям на образцовых (эталонных) устройствах.

Принципиальная конструкция средства контроля линейности приведена на рис. 6. На разработанное средство контроля линейности получен патент [7].

Выпускаемый нами в настоящее время комплект приспособлений для проверки основных характеристик иммуноферментных анализаторов планшетного типа (КПА-01-«МАРТ») обеспечивает контроль в процессе эксплуатации следующих характеристик иммуноферментных анализаторов:

- правильность установки планшета в позиции измерения (позиционирование);
- воспроизводимость результатов в диапазоне измерения оптической плотности от 0 до 2,5 Б;
- правильность установки рабочей длины волны измерительного светового потока (405, 450, 490, 570, 620 нм);
- стабильность спектральной характеристики;
- идентичность измерительных каналов многоканального анализатора;

- правильность работы в специальных режимах. Комплект КПА-01 зарегистрирован в реестре медицинских изделий РФ с 1998 г. (последнее регистрационное удостоверение № ФСР 2010/07601 от 28.10.2013 г.).

Помимо применения КПА-01 для систематического контроля иммуноферментных анализаторов, существует возможность его использования для первичной и периодической метрологической поверки. Для этой цели КПА-01 должен комплектоваться светофильтрами, прошедшими государственную аттестацию.

Применяемые в практике поверки первых российских иммуноферментных анализаторов конструкции на основе твердотельных элементов в виде нейтральных светофильтров различной толщины размерами 40×40 мм в недостаточной мере имитировали реальные планшеты, не обеспечивали взаимно однозначного соответствия между лунками планшета и их имитацией, что приводило к некорректности поверки из-за несоответствия условий эксплуатации и поверки.

Кроме того, неравномерность оптических характеристик, клиновидность светофильтров больших размеров, наличие взаимной засветки между каналами приводили к погрешности тестовых измерений в разных каналах иммуноферментных анализаторов.

Погрешность поверки квадратных светофильтров была задана в единицах светопропускания и составила $\pm 0,25 \%$, что усложнило оценку результатов измерения оптической плотности исследуемых растворов. Кроме того, такая погрешность слишком груба для поверки новых моделей анализаторов.

Для поверки иммуноферментных планшетных анализаторов нами разработан поверочный комплект светофильтров КСП-01, который как средство измерения занесен в Госреестр средств измерений (сертификат Госстандарта РФ об утверждении типа средств измерений № 18091-03 от 30.09.2003 г.) и применяется в качестве рабочего эталона при поверке иммуноферментных анализаторов.

Поверочный комплект светофильтров КСП-01, содержащий набор нейтральных аттестованных светофильтров, позволяет выполнять метрологическую поверку планшетных анализаторов в диапазоне оптической плотности от 0 до 4,0 Б на длинах волн 405, 450, 480, 490, 540, 570, 620, 630 нм и в диапазоне оптической плотности от 0 до 1,5 на длине волны 340 нм. При этом погрешность аттестации КСП-01 реализуется на уровне предельных возможностей Госстандарта РФ. Сегодня аттестация в организации Госстандарта (ФГУП ВНИИО-ФИ, Москва) обеспечивается с погрешностью:

- в диапазоне от 0,000 до 0,400 Б — $+ 0,006$ Б;
- в диапазоне от 0,401 до 4,000 Б — $+ 1,5\%$.

Поверочные светофильтры комплекта КСП-01 и контрольные светофильтры комплекта КПА-01

имеют идентичное конструктивное исполнение, что позволяет при поверке использовать установочные элементы, входящие в состав КПА-01.

На основании информации, получаемой от потребителей, мы определили направления дальнейшего развития изделия и постоянно совершенствовали комплект КСП-01 в целях расширения его функциональных возможностей и области применения.

По просьбам пользователей был оптимизирован и расширен в длинноволновую часть видимого излучения спектральный диапазон (длины волн 650, 690 и 750 нм). Для длины волны 340 нм был увеличен диапазон оптической плотности (до 2,7 Б) введением дополнительного светофильтра.

Усовершенствованная модель поверочного комплекта светофильтров КСП-02 зарегистрирована в Госреестре средств измерений РФ в 2008 г. под № 38817-08 (свидетельство об утверждении типа RU.C.37.003.A № 33042 Госстандарта России, действительно до 12.07.2018 г.).

По конструкции светофильтры комплектов КСП-02 и КСП-01 идентичны, но усовершенствованное изделие обладает более широкими функциональными возможностями. Комплекты КСП-02 выпускаются в трех исполнениях:

- поверочный комплект светофильтров КСП-02В (для видимой области) содержит девять аттестованных нейтральных светофильтров с оптической плотностью в диапазоне от 0,030 до 3,000 Б для поверки анализаторов на длинах волн 405, 450, 490, 540, 570, 600, 620, 650, 690 и 750 нм;

- поверочный комплект светофильтров КСП-02У (для УФ-области) содержит четыре аттестованных нейтральных светофильтра с оптической плотностью в диапазоне от 0,030 до 2,7 Б для поверки анализаторов на длине волны 340 нм;

- поверочный комплект светофильтров КСП-02В3/4 (для видимой области, с оптической плотностью от 3 до 4 Б) содержит три аттестованных нейтральных светофильтра с оптической плотностью в диапазоне от 2,7 до 4,5 Б для поверки на длинах волн 405, 450, 490, 540, 570, 600, 620, 650, 690, 750 нм.

В результате поверки светофильтров комплекта КСП-02 согласно государственной поверочной схеме по ГОСТ 8.557–2007 улучшились метрологические характеристики — почти в два раза снизились погрешности значений спектральной оптической плотности светофильтров в диапазоне до 3,0 Б. Именно в этом диапазоне находится большинство результатов иммуноферментного и биохимического анализа.

Уменьшение погрешности средств поверки позволяет контролировать большой ряд современных анализаторов повышенной точности.

Сегодня аттестацию светофильтров обеспечивает ВНИИОФИ. Пределы допускаемой погрешности значений спектральной оптической плотности светофильтров не превышают:

- в диапазоне 0,030–1,000 Б — $\pm 0,003$ Б;
- в диапазоне 1,001 ... 2,000 Б — $\pm 0,006$ Б;
- в диапазоне 2,001 ... 3,000 Б — $\pm 0,025$ Б;
- в диапазоне 3,001 ... 4,00 Б — $\pm 0,090$ Б.

Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии разработаны и введены в действие с 01.01.2011 г. «Рекомендации по метрологии Р 50.2.066–2009» [8]. В них содержится методика поверки иммуноферментных анализаторов, в которой в качестве средств поверки указаны поверочные комплекты светофильтров КСП-01 и КСП-02.

Устройство для поверки и контроля иммуноферментных и биохимических анализаторов, содержащее комплект светофильтров (аттестованных или неаттестованных) и установочные элементы, показано на рис. 7.

В последнее время парк применяемых в медицинской практике иммуноферментных анализаторов стал пополняться спектрофотометрическими планшетными анализаторами, оснащенными монохроматорами, которые можно использовать для измерения любой длины волны внутри рабочего спектрального диапазона. Например, планшетный спектрофотометр Multiskan GO фирмы Thermo Fisher Scientific (США); спектрофотометр xMark фирмы Bio-Rad (США); однорежимный ридер (спектрофотометр) для микропланшетов 190-Molecular Devices фирмы Molecular Devices (США).

Метрологическая поверка приборов такого типа должна включать поверку не только фотометрической шкалы, но и шкалы длин волн.

В целях метрологического обеспечения спектрофотометрических планшетных анализаторов, оснащенных монохроматором, в настоящее время нами разрабатывается новый поверочный комплект светофильтров КСП-03. Этот комплект конструктивно исполнен аналогично выпускаемому комплекту КСП-02, однако в его состав дополнительно включены:



Рис. 7 Комплект для поверки и контроля иммуноферментных и биохимических анализаторов

- светофильтр из цветного оптического стекла марки ПС 7 (ГОСТ 9411-91), позволяющий контролировать шкалу длин волн спектрофотометрических анализаторов;

- светофильтр с оптической плотностью 3,0–3,5 Б на длине волны 340 нм, расширяющий контролируемый диапазон фотометрической шкалы.

Кроме того, в комплекте КСП-03 расширена до 300 нм включительно номенклатура поверяемых длин волн в УФ-диапазоне спектра.

В настоящее время комплект КСП-03 проходит во ВНИИОФИ испытания в целях утверждения типа средства измерения.

Таким образом, итогом нашей работы явилось обеспечение всего парка фотометрических иммуноферментных планшетных анализаторов средствами метрологической поверки, которые предписаны для использования Рекомендациями Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии.

После завершения испытаний в целях утверждения типа средства измерения и регистрации КСП-03 в Государственном реестре наша организация начнет выпуск и реализацию этого комплекта для обеспечения средством поверки (наряду с фотометрическими анализаторами) и современных спектрофотометрических планшетных анализаторов.

Также выпускается средство внутрилабораторного контроля работоспособности планшетных анализаторов в процессе эксплуатации, регулярное применение которого в клинико-диагностических лабораториях позволит повысить достоверность проводимых исследований.

Литература

1. Алипов А. Н., Муравник Л. М., Ронжина Н. Л., Сафьянников Н. М. Медицинские лабораторные фотометрические приборы и комплексы. Под ред. Н. М. Сафьянникова. СПб.: Реноме, 2010. 504 с.
2. Зудилина О. Б., Кострова О. Б., Ландау И. Б., Сафьянников Н. М. Внутрилабораторный контроль качества фотометрических медицинских анализаторов // Современная лаборатория. 2012. № 2. С. 52–54.
3. Козлов А. П., Веревошкин С. В. Итоги программы внешнего контроля качества лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции в России (1992–1996) // Русский журнал «ВИЧ/СПИД и родственные проблемы». 1997. Т. 1, № 1. С. 61–68.
4. Пат. РФ № 2079821, кл. G 01 J 1/04. Планшет для тестирования иммуноферментных анализаторов / О. Б. Кострова, Л. М. Муравник, Н. М. Сафьянников. № 95112880/25; Оpubл. 20.05.97, Бюл. № 14.
5. Пат. РФ № 2189028, кл. G 01 N 21/59. Планшет для тестирования иммуноферментных анализаторов / О. Б. Кострова, И. Б. Ландау, Л. М. Муравник, Н. М. Сафьянников. № 2000120554/28; Заявитель: Сафьянников Н. М.; Заявл. 31.07.2000; Оpubл. 10.09.2002. Бюл. № 25.
6. Алипов А. Н., Бойцов А. Г., Муравник Л. М., Сафьянников Н. М. [и др.]. Техническое оснащение лабораторных исследований. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т. / [В. В. Алексеев и др.]; под ред. А. И. Карпищенко. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. Т. 1. Гл. 3. С. 39–133.
7. Пат. №2362129, кл. G01J1, G01N21/59. Планшет для тестирования иммуноферментных анализаторов / О. Б. Кострова, И. Б. Ландау, Л. М. Муравник, И. Н. Сафьянников. № 2007149363/28; Заявитель: ООО «Метромед»; Заявл. 29.12.2007; Оpubл. 20.07.2009.
8. Рекомендации по метрологии Р 50.2.066–2009. Анализаторы иммуноферментные. Методика поверки. М.: Стандартинформ, 2010.