

ЗАО «ЭКОлаб», ООО «СИНТЭКО-КОМПЛЕКС»

**КОМПЛЕКС АППАРАТНО-ПРОГРАММНЫЙ
ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛАТЕКСНЫХ
АГГЛЮТИНАЦИОННЫХ, ГЕМАГГЛЮТИНАЦИОННЫХ
АНАЛИЗОВ, ИЗОСЕРОЛОГИЧЕСКИХ
И ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
«ЭКСПЕРТ-ЛАБ»**

АДАПТИРОВАН К РЕАГЕНТАМ И ТЕСТ СИСТЕМАМ
ЗАО «ЭКОЛАБ»

Москва 2008

УДК
ББК

ISBN 5-8311

ВВЕДЕНИЕ

Бурно развивающимся направлением внедрения компьютерных технологий в лабораторную диагностику является получение аналитической информации с помощью применения видеоцифровых подходов. Видеоцифровые камеры или сканеры в сочетании с программами анализа изображений уже широко используются для регистрации результатов электрофоретических исследований, тестов сухой химии, иммунохроматографических тестов, ряда методик изосеродогии, для технологии микрочипов.

Видеоцифровая регистрация перспективна для широко используемых иммунологических тестов, где интерпретация результатов базируется на визуальной оценке — тесты латексной агглютинации, методы пассивной гемагглютинации (РПГА), изосерологические анализы (определение групп крови) и некоторые другие. Сохранение и обработка изображения, оценка результатов с привлечением программных методов поднимает перечисленные выше тесты на принципиально более высокий уровень достоверности результатов. Возможности применения видеоцифровых технологий для лабораторных исследований значительно расширились благодаря сканерным устройствам.

НАЗНАЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА

Многофункциональная регистрирующая система на основе компьютера и сканера высокого разрешения в сочетании с программным обеспечением «Эксперт-Лаб» позволяет проводить с помощью одного устройства объективизацию, интерпретацию и документирование результатов различных иммунологических исследований.



Рис. 1. Сканерное регистрирующее устройство комплекса «Эксперт-Лаб» с установленным планшетом.

Гемагглютинационные исследования. Обеспечивается документирование, интерпретация результатов тестов РПГА.

Иммуноферментные исследования. Комплекс «Эксперт-Лаб» является точным и надежным иммуноферментным ридером.

Латексные агглютинационные тесты. Комплекс «Эксперт-Лаб» обеспечивает объективизацию, регистрацию результатов тестов.

Иммунохроматографические тесты. Регистрация, объективная интерпретация результатов экспресс-тестов.

КРАТКИЙ ПРИНЦИП РАБОТЫ СИСТЕМЫ

Компоненты системы и программное обеспечение устроены настолько просто, что не требуют от персонала никакой специализированной подготовки.

Для регистрации результатов какого-либо теста необходимо установить планшет после проведенной реакции в сканер, затем открыть соответствующую тесту программу, выбрать нужную методику и нажать кнопку ввода изображения. Сканер получит и передаст изображение объекта в компьютер. После ввода изображения программа обеспечит его обработку и интерпретацию результата. Программное обеспечение адаптировано к тестам и наборам производимым ЗАО «ЭКОлаб».

Комплекс «Эксперт-Лаб» зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Минздравсоцразвития РФ. Регистрационное удостоверение № ФС 02012006/3617-06 от 10.08.2006 г.

По результатам конкурса инновационных работ комплекс завоевал большую золотую медаль ВДНХ на выставке «Росбиотех-2007».



ЛАТЕКСНЫЕ АГГЛУТИНАЦИОННЫЕ ТЕСТЫ

Латексные диагностикумы - это препараты, которые представляют собой суспензию монодисперсного латекса с иммобилизованными на его поверхности специфическими антителами. При смешивании латексного реагента с исследуемой сывороткой, при наличии в последней соответствующих антигенов, они специфически взаимодействуют с антителами, сорбированными на латексе, что приводит к агглютинации латексных частиц.

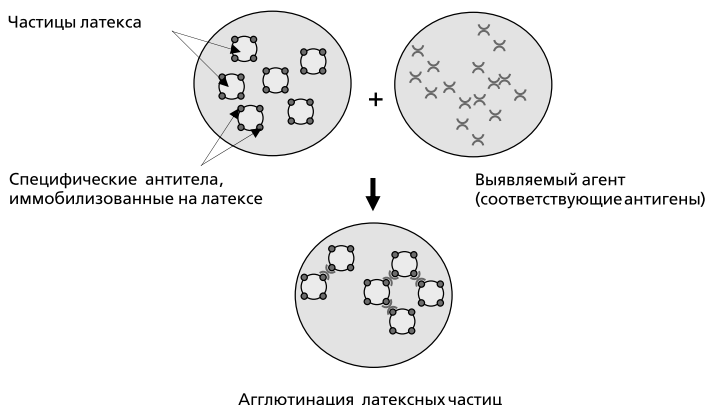
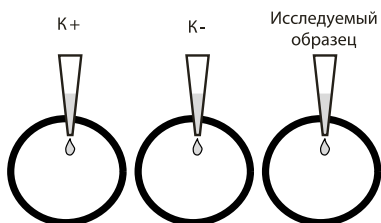


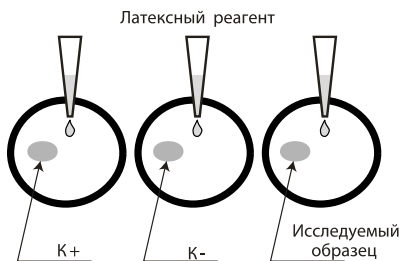
Рис. 2. Принцип реакции агглютинации латекса

Технически постановка реакции очень проста.

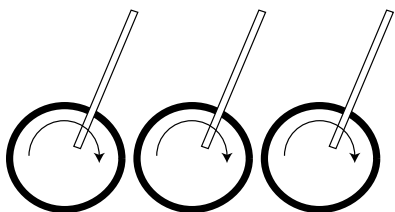
Типовая схема постановки реакции



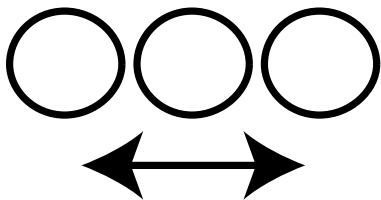
Нанести на стеклянную пластинку (первую ячейку тестового слайда) 20 мкл К+, рядом, с интервалом 2-3 см (на соседнюю ячейку) - 20 мкл К-. На оставшиеся ячейки нанести по 20 мкл исследуемых образцов. Сыворотку перед исследованием не разбавлять!



Легким встряхиванием флакона перемешать латексный реагент и добавить по 20 мкл в каждую ячейку с образцом.



Плоским концом пипетки-мешалки (стеклянной палочкой) тщательно перемешать каждую каплю (распределить реакционную смесь по всей площади ячейки). Для каждой капли использовать новую пипетку-мешалку (стеклянную палочку).



Покачивать слайд или планшет в течение 2 минут, после чего сразу произвести учет результатов реакции.

Положительную реакцию – конгломераты склеившихся латексных частиц, можно наблюдать невооруженным глазом уже через 2 минуты.

Учет результатов

Учет результатов проводят визуально на темном фоне при хорошем освещении.



Положительной реакцией является агглютинация латекса (любое появление зернистости или различных частиц).



Реакция считается отрицательной при отсутствии агглютинации (жидкость в тестовой ячейке остается мутной и однородной).

Относительная дешевизна анализа, высокая чувствительность, специфичность и воспроизводимость метода, простота и возможность постановки теста практически в любых условиях делают латексные диагностикумы очень удобными как при одиночных, так и при массовых исследованиях даже в небольших клинических лабораториях.

В настоящее время ЗАО «ЭКОлаб» выпускает диагностикумы с использованием латексных реагентов для качественного и полуколичественного определения антигенов

Для документирования и объективизации латекс-агглютинационных исследований с помощью комплекса «Эксперт-Лаб»

реакцию проводят в крышках 96-ти луночных планшетов. Реакция проводится так же как описано выше, но с использованием меньшего объема латексной суспензии и образца (по 10 мкл).

АСО латекс-тест

АСО-латексный реагент (взвесь частиц латекса с иммобилизованным на их поверхности стрептолизин-О) в комплекте с глицин-солевым буферным раствором и контрольными сыворотками.

НАЗНАЧЕНИЕ: Качественное и полуколичественное определение антистрептолизина-О в сыворотке крови человека при диагностике и контроле терапии ревматической лихорадки, острого ревматоидного

артрита, гломерулонефрита и других заболеваний, вызванных β -гемолитическими стрептококками группы А .

Диагностикум позволяет обнаруживать АСО в концентрации от 200 МЕ/мл и выше в неразбавленной сыворотке крови человека.

Набор рассчитан на 250 определений

Срок годности – 2 года.

СРБ-латекс-тест

СРБ-латексный реагент (взвесь латексных частиц с иммобилизованными на их поверхности козьими антителами к СРБ человека) в комплекте с глицин-солевым буферным раствором и контрольными сыворотками

НАЗНАЧЕНИЕ: Качественное и полуколичественное определение СРБ в сыворотке крови человека при контроле динамики воспалительных процессах различной этиологии

Диагностикум позволяет обнаруживать СРБ в концентрации от 6 мг/л и выше в неразведенной сыворотке крови человека.

Набор рассчитан на 250 определений

Срок годности – 2 года

РФ-латекс - тест

РФ-латексный реагент (взвесь частиц латекса с иммобилизованным на их поверхности человеческим иммуноглобулином класс G) в комплекте с глицин-солевым буферным раствором и контрольными сыворотками

НАЗНАЧЕНИЕ: Выявление и определение концентрации РФ в сыворотке крови человека для диагностики ревматоидного артрита, изучения динамики болезни и контроля проводимой терапии.

Диагностикум позволяет обнаруживать РФ в концентрации 8 МЕ/мл в неразведенной сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 250 определений

Срок годности – 2 года

Диагностические системы на основе латексной агглютинации получили широкое распространение в лабораторной диагностике благодаря очевидным достоинствам: высокая чувствительность, быстрота и простота постановки, минимум реагентов.

Система «Эксперт-Лаб» с программой «Эксперт-Лаб Агглютинация» обеспечивает регистрацию результатов тестов латексной агглютинации при постановке реакции на крышках 96-луночных планшетов для ИФА. Она позволяет получать первичные изображения всех тестов (до 96, включая контроли), поставленных на носителе. Программными методами обеспечивается возможность контрастирования, увеличения размеров, сопоставления изображений индивидуальных образцов (например, контролей и анализируемых образцов). Также с помощью специальных приемов обработки изображений можно получить и объективные цифровые значения, характеризующие интенсивность реакции.

На рисунке 3 показано основное окно программы «Эксперт-Лаб Агглютинация». В левой нижней части окна по выбору оператора может быть представлено либо первичное изображение всего планшета, либо контрастированное изображение, либо математически обработанное, отображающее количество агглютинатов.

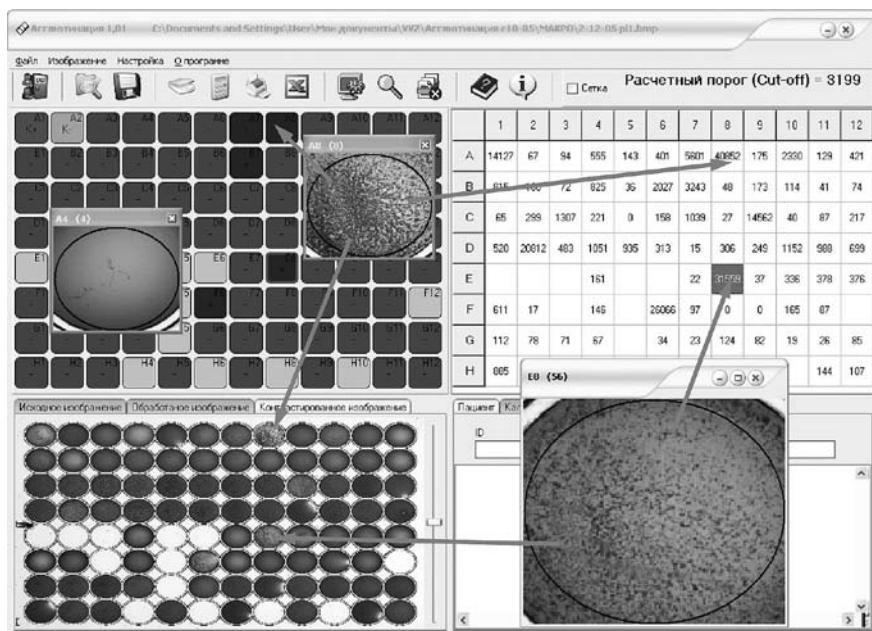


Рис. 3. Основное окно программы «Эксперт-Лаб Агглютинация»

Возможность сопоставить увеличенные, контрастированные и обработанные математически изображения лунок, соответствующих тестируемым образцам и контролям, значительно повышают объективность оценки результатов и помогают избежать ошибок оператора.

Компьютерная программа позволяет также ввести и сохранить протокол анализа (расположение контрольных и тестируемых образцов и их разведений и дублирование). На рис. 3 показано меню для заполнения протокола, в котором оператор для каждой лунки выбирает тип образца из списка.



Рис. 4. Заполнение протокола анализа

Система «Эксперт-Лаб» обеспечивает быстрое считывание, распознавание, документирование, объективизацию и регистрацию результатов тестов латексной агглютинации. Система адаптирована ко всем наборам с применением этой методики, производимым ЗАО «ЭКОлаб»

РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РПГА)

Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) основана на регистрации формирования агрегатов эритроцитов барана или куриных эритроцитов, сенсibilизированных антителами или антигенами, в присутствии соответствующих детектируемых антигенов или антител. В случае отсутствия агглютинации (при отрицательном результате) на

дне используемых круглодонных планшетов образуется компактный осадок, выглядящий, как темная точка. При положительной реакции - ровный слой («зонтик») агглюнированных эритроцитов, распределенных по дну лунки. При слабоположительной реакции эритроциты образуют характерное кольцо с небольшим просветом в центре. При отрицательной реакции - компактный осадок эритроцитов («пуговка») в центре лунки.

В качестве подтверждающего теста на сифилис может быть использован и выпускаемый диагностиком «ЭКОлаб-РПГА-тест», основанный на использовании реакции пассивной геммагглютинации.

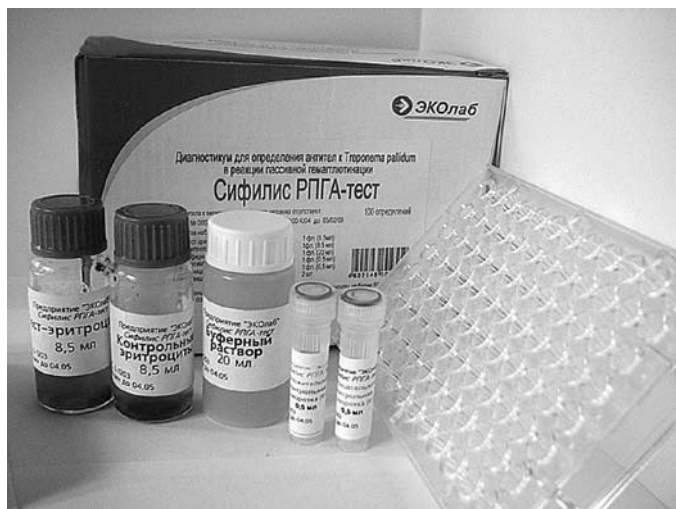


Рис. 5. Комплект набора «Сифилис РПГА-тест»

В качестве иммуносорбента используется специально обработанные куриные эритроциты, на которые нанесен антиген (смесь специфических белков *Treponema pallidum*).

Постановка реакции очень проста.

При качественном определении исследуемую пробу, разведенную 1:20, вносят в лунки круглодонного планшета и смешивают с тест-эритроцитами (ТЭ) (иммуносорбент) и контрольными эритроцитами (КЭ). После инкубации в течение 45 минут при комнатной температуре визуально учитывают результат.

Степень позитивности результата оценивается по реакции с контрольными образцами сывороток. Контрольные (несенсибилизированные) эритроциты используются для контроля специфичности реакции.

Для получения надежных результатов необходимо соблюдать такие простейшие правила работы:

- в лаборатории не должно быть источников вибрации,
- должен быть выдержан температурный режим (18 – 25 °С),
- необходимо правильно пипетировать,
- круглодонный планшет должен использоваться однократно.

Тест высоко чувствителен и высоко специфичен.

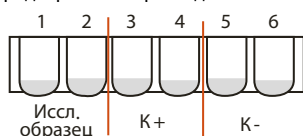
Так, по данным ЦКВИ различные диагностические тесты на сифилис характеризуются следующей чувствительностью:

РПГА	– 99,4 %
РИФ-абс	– 99,1 %
РИФ-200	– 99,1 %
РИТ	– 87,7 %
МР	– 95,8 %
РСК с трепонемным антигеном	– 95,8 %
РСК с кардиолипидным антигеном	– 90,2 %

СХЕМА ПОСТАНОВКИ И УЧЕТА РПГА

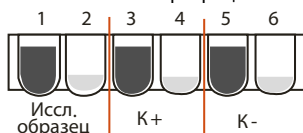
Качественное определение

Внесение образцов
(предварительно разведены 1:20 в БР)



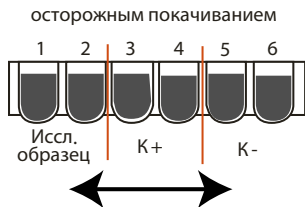
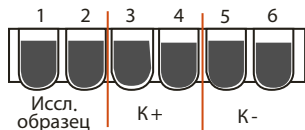
Внести по 25 мкл каждого образца, предварительно разведенного 1:20, в две смежные лунки.

Внесение тест-эритроцитов



В одну из двух лунок с каждым разведенным образцом внести по 75 мкл ТЭ

Внесение контрольных эритроцитов



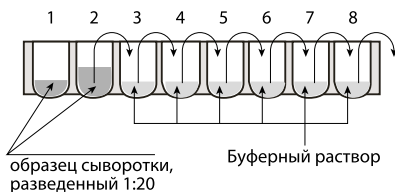
Во вторую лунку с каждым разведенным образцом внести по 75 мкл КЭ

Планшет осторожно покачать, чтобы перемешать содержимое лунок, и выдержать не менее 45 мин. при комнатной температуре, после чего учесть результаты реакции.

В пробах, давших положительную или слабоположительную реакцию при качественном определении, определяют титр антител к *Treponema pallidum*.

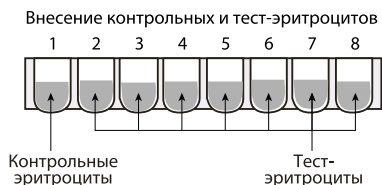
Определение титра антител

Приготовление серийных 2-кратных разведений исследуемых контрольных образцов

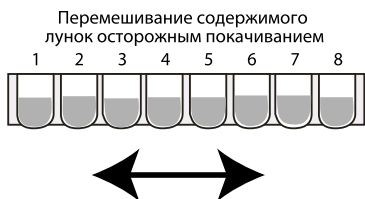


Для титрования использовать по 8 лунок в каждом ряду планшета (один ряд для каждого исследуемого образца, включая K+). В первые лунки всех рядов внести по 25 мкл соответствующих образцов, разведенных 1:20, во все остальные - по 25 мкл БР

Приготовить серийные двукратные разведения каждого образца, (от 1:40 в лунке 2 до 1:2560 в лунке 8), из лунки 8 удалить 25 мкл полученного раствора.

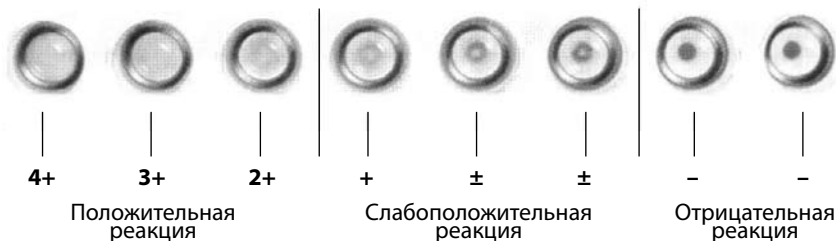


В первую лунку каждого ряда внести по 75 мкл КЭ, во все остальные лунки – по 75 мкл ТЭ



Планшет осторожно покачать, чтобы перемешать содержимое лунок, и выдержать не менее 45 мин. при комнатной температуре, после чего учесть результаты реакции.

Титром антител к *Трепонема pallidum* в исследуемом образце считается последнее разведение, в котором получена положительная или слабоположительная реакция:



Ровный слой («зонтик») агглютированных эритроцитов, распределенных по дну лунки.

Эритроциты образуют характерное кольцо с небольшим просветом в центре

Компактный осадок эритроцитов («пуговка») в центре лунки

Основное окно и функции программы «Эксперт-Лаб РПГА» аналогичны программе для латексных тестов с той разницей, что для программной оценки интенсивности реакции и дискриминации положительных и отрицательных результатов применены иные, специально разработанные алгоритмы расчетов.

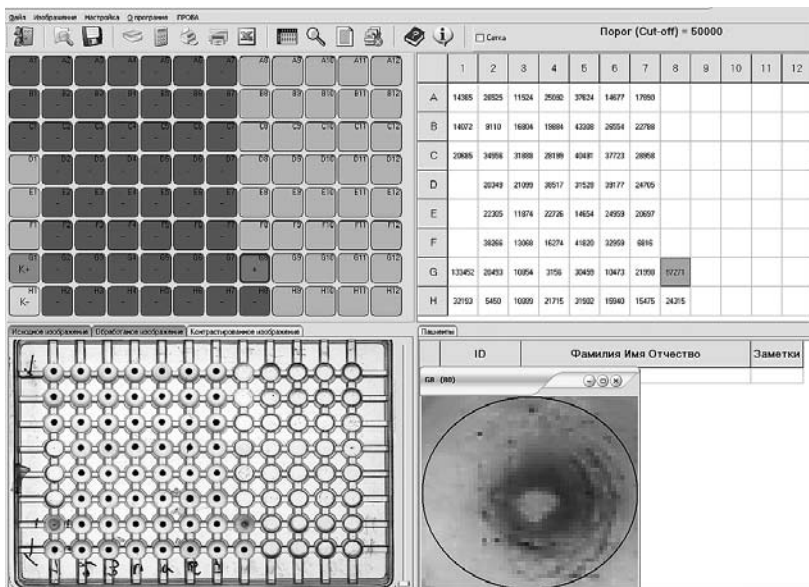


Рис. 6. Основное окно программы «Э-Лаб РПГА» с программным определением положительных и отрицательных образцов

На рис. 4 показано основное окно программы с дискриминацией положительных и отрицательных образцов сыворотки крови в исследовании на наличие антител к *Treroneма pallidum*. Аналогичные результаты получаются и с другими тестами для РПГА. Программа позволяет регистрировать результаты с возможностью сопоставления увеличенных изображений лунок и архивирования первичных изображений. Интенсивность реакции может выражаться как в виде числовых значений, так и в виде принятых в настоящее время терминах обозначения интенсивности при визуальной оценке (в «крестах»).

РАБОТА С ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ АНАЛИЗОМ (ИФА)

Кратко принцип метода ИФА заключается в следующем. При наличии в исследуемой сыворотке антител или антигенов, на поиск которых направлено исследование, они связываются с соответствующими антигенами или антителами, сорбированными в лунке планшета. Образовавшиеся комплексы выявляются затем с использованием конъюгата с ферментом и цветной реакцией с субстратом этого фермента.

Благодаря высокой чувствительности и специфичности метода ИФА, доступности специализированного оборудования для его проведения, широкому спектру выпускаемых наборов реагентов он стал одним из самых массовых в практике лабораторных исследований.



Рис. 7. Комплект набора «ЭКОлаб-Антипаллидум-скрин»

Для применения сканера в качестве иммуноферментного анализатора нами разработана программа «Эксперт-Лаб ИФА», которая на основе регистрируемого сканером изображения микропланшета (или стрипа) позволяет вычислить оптические плотности субстрата в лунках.

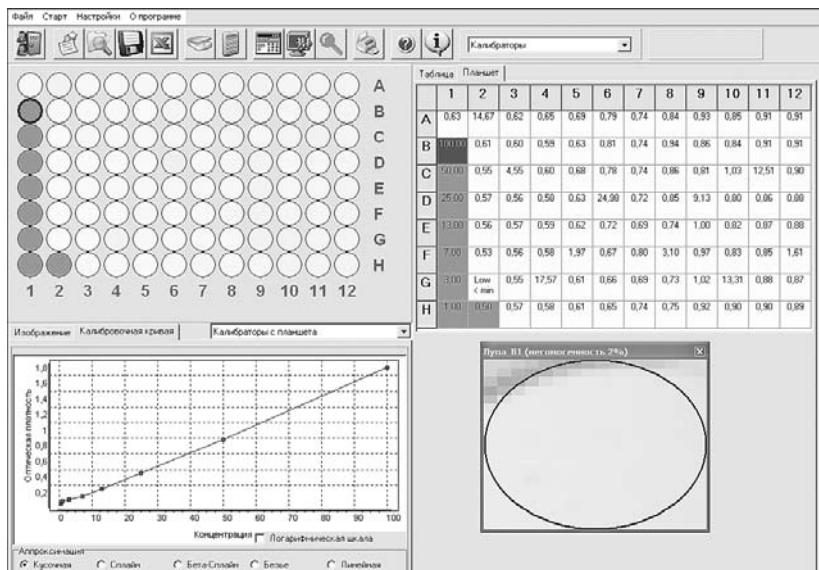


Рис. 8. Основное окно программы «Эксперт-Лаб ИФА»

На рис. 8 представлено основное окно программы «Эксперт-Лаб ИФА». В левом нижнем углу экрана представлена калибровочная кривая при постановке количественных реакций ИФА с калибраторами. В правой верхней части экрана показаны результаты измерений оптической плотности. В меню «Редактор методик» можно задать тип анализа, варианты цветового выделения положительных и отрицательных результатов, варианты расчета порогов при пороговом анализе, а также тип субстрата.

Бесспорными достоинствами комплекса «Эксперт-Лаб» и его программного обеспечения является готовность адаптации к конкретным задачам и возможность увеличения количества функций.

В настоящее время уже существует программа «Эксперт-Лаб Видеотест», предназначенная для обработки и документирования результатов иммунохроматографических тестов для обнаружения наркотиков, онкомаркеров, кардиомаркеров и инфекций в биологических жидкостях. Так же есть рабочий вариант программного обеспечения «Эксперт-

Лаб Изосерология», которое позволяет регистрировать результаты определений группы крови и резус-фактора.

В дальнейшем планируется выпустить программу «Эксперт-Лаб Блот» для оценки и документирования результатов иммуноблоттинга при выявлении антител к ВИЧ 1,2 и программу для регистрации биохимических определений.

Пользователи такого комплекса для расширения возможностей своей лаборатории приобретают только новую программу, а не специализированное оборудование.

Многофункциональная сканерная система «Эксперт-Лаб» с соответствующим пакетом программного обеспечения может рассматриваться как стержневой комплекс, обеспечивающий регистрацию результатов практически всего спектра иммунологических исследований, проводимых в малых и средних лабораториях.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
НАЗНАЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА	4
КРАТКИЙ ПРИНЦИП РАБОТЫ СИСТЕМЫ	5
ЛАТЕКСНЫЕ АГГЛЮТИНАЦИОННЫЕ ТЕСТЫ	6
РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РПГА)	11
СХЕМА ПОСТАНОВКИ И УЧЕТА РПГА	13
РАБОТА С ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ АНАЛИЗОМ (ИФА).	17