

ИМУНОЕНЗИМНИ МЕТОДИ. СЪЩНОСТ, ОСНОВНИ МОДИФИКАЦИИ, КОНТРОЛ НА ОСНОВНИТЕ ПАРАМЕТРИ, АВТОМАТИЗАЦИЯ И КОМПЮТЕРИЗАЦИЯ, СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ

Д-р Жанина Йорданова Иванова дм,



ИМУНОЕНЗИМНИ МЕТОДИ

- ▶ Имуноензимните методи в трансфузионна хематология се използват за откриване на маркери на трансмисивни инфекции в дарена кръв. Преимуществата на тези методи са тяхната достъпност и простота, стабилност на реагентите, бързина на изпълнение, възможност за автоматизиране. Благодарение на биотехнологиите ИЕМ се усъвършенстват все повече, тъй като с помощта на генното и клетъчното инженерство се получават във високо пречистен вид недостъпни антигени, ензимни маркери и техни конюгати, моноклонални антитела с определена специфичност и афинитет, рекомбинантни протеини и синтетични пептиди.

Същността на ИЕМ

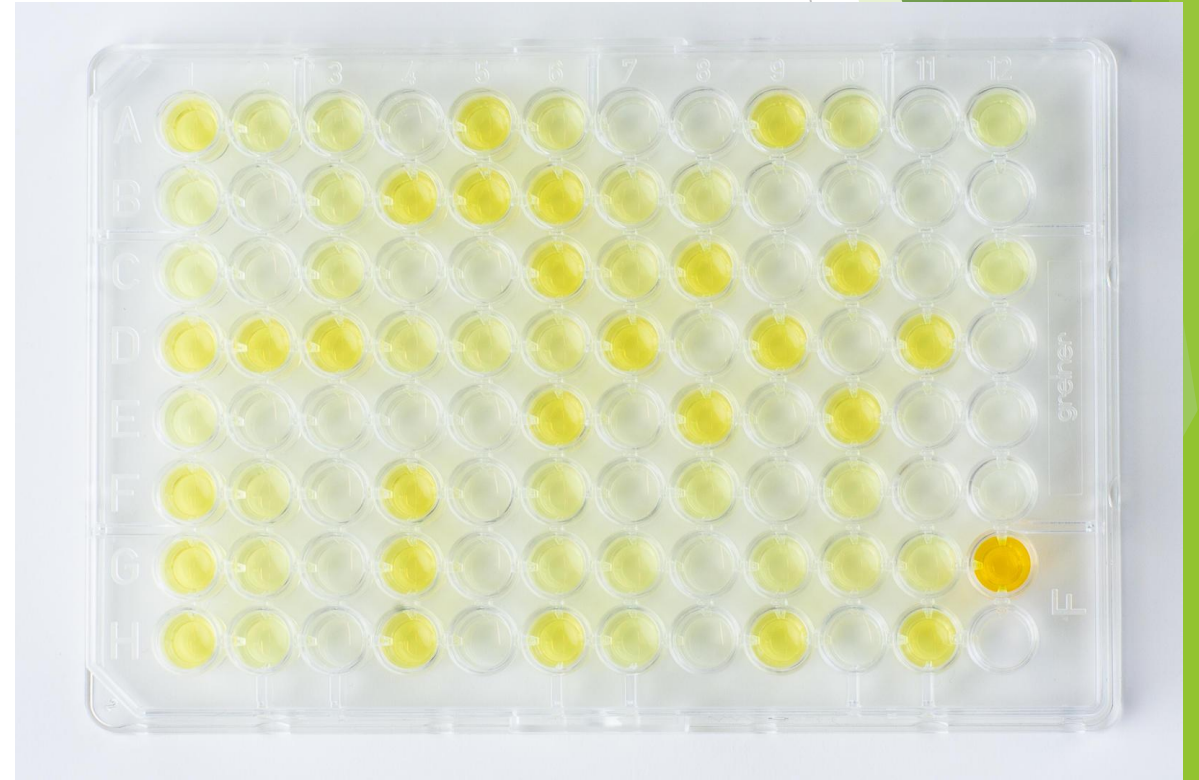
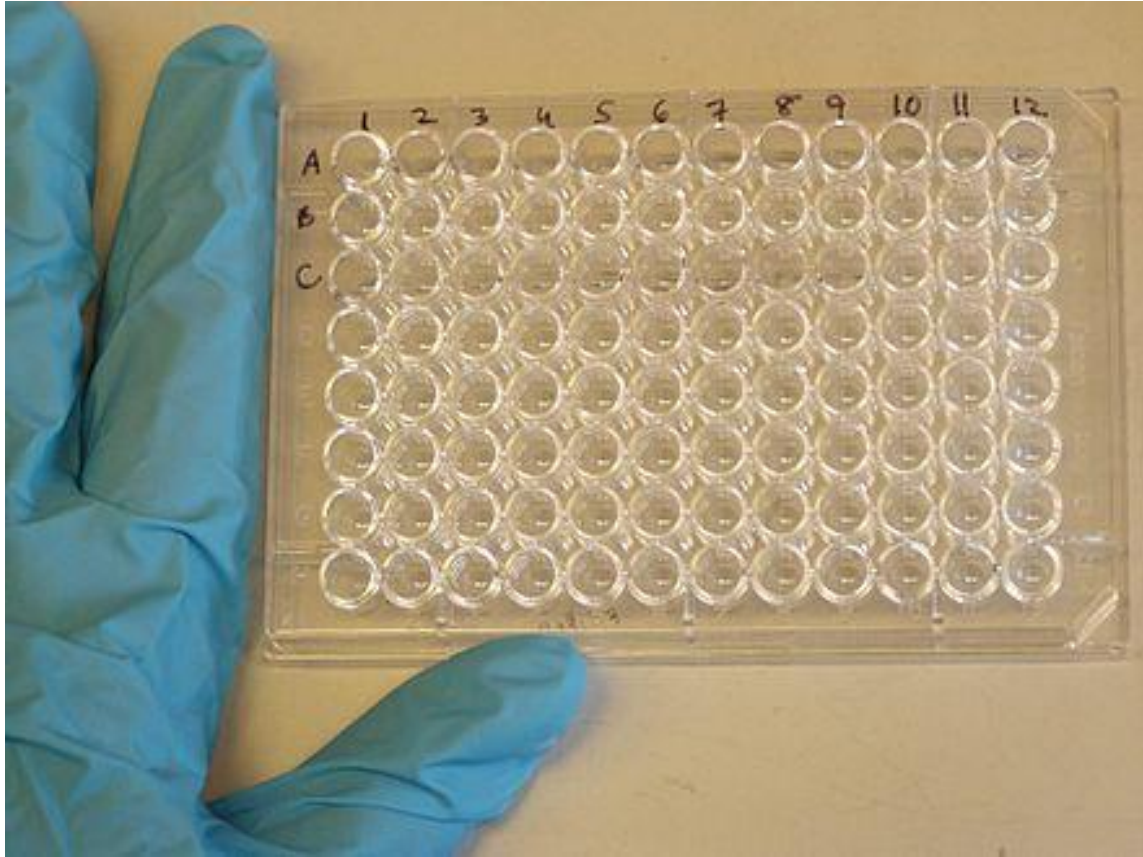
- ▶ ИЕМ в основата си са имунологични методи. Това осигурява високата им специфичност при подбор на подходящи специфични антигени и антитела.
- ▶ ИЕМ са същевременно и ензимологични - с ензими като маркери се постига висока специфичност и чувствителност благодарение на усиливащия ефект на ензимната реакция.
- ▶ Основен белег на ИЕМ е довеждането на крайната реакция до превръщането на определен субстрат с продукт, по който се отчита реакцията. За тази цел някой от компонентите, участващите в имунната реакция, трябва да бъде маркиран с ензим. В зависимост от модификации на ИЕМ с ензим се бележат или антигенът, или антитялото. Най-често за маркиране на имунологично реагиращи компоненти на ИЕМ се използват ензимите алкална фосфатаза и пероксидаза. За определяне на ензимната активност са разработени няколко основни метода - колориметричен, флуоресцентен, лУминесцентен.
- ▶ При болшинство от ИЕМ се измерва фотометрично или процесът на промяна в концентрация на субстрата, или продукта на ензимната реакция. При тези процеси се измерва или началната скорост на реакцията, или крайната оптична плътност на продукта, получен за определени време на реакцията.

ГРУПИ ИЕМ

- ▶ 1. Методи без разделяне на компоненти (несепарационни или методи на хомогенен анализ)
- ▶ 2. Методи с разделяне на компонентите (хетерогенни или твърдефазови методи). Според класификацията на Ngo и Lenhoff към тази група се причисляват: конкурентен метод, Сандвич метод, имуноензимометричен метод, инхибиционен метод, индиректен метод, метод с допълнителни белязани ензимно-антигенни конюгати, метод, основаващ се на пространствени затруднения.

Твърдофазови методи

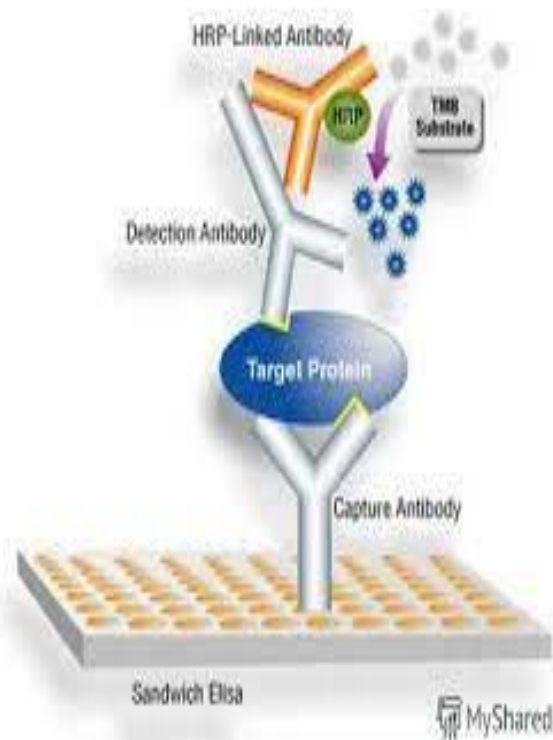
- ▶ Твърдофазови методи се основани на принципа на имобилизиране на антигени или антитялото върху неразтворим (твърдофазов) носител. С носителите антигените или антителата се свързват с ковалентни връзки или се абсорбират на повърхността на материали от непористи полимери.
- ▶ Най-широко приложение днес намират микроплаките с 96 гнезда, които позволяват провеждането на цялото изследване (от имобилизацията до измерването на ензимната активност) в едно и също гнездо.



Основни модификации на ИЕМ.

1. ИЕМ тип "сандвич".

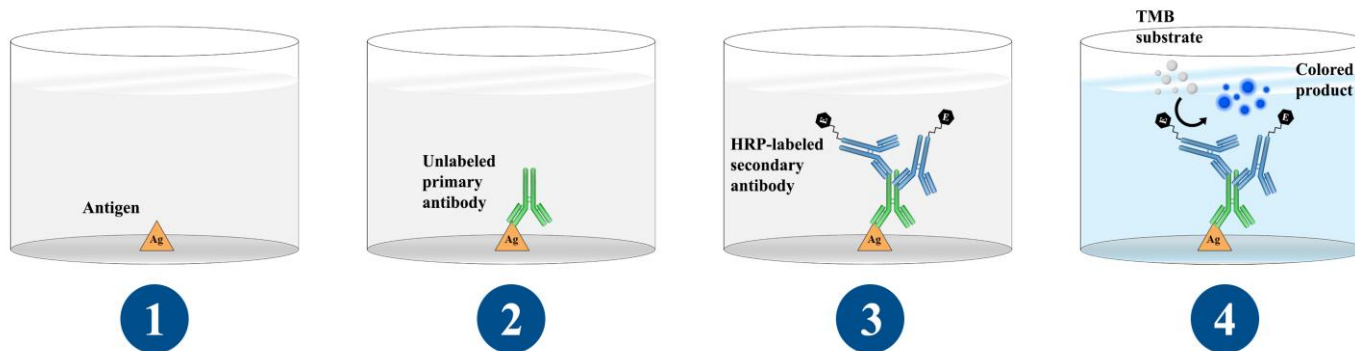
- ▶ Този метод е един от най-често използваните ИЕМ. Върху твърдата фаза се имобилизират антигени, когато в изследвания материал се търси наличие на съответните антитела и обратно, антитела, когато се търсят антигенни форми.



с антигените или антителата с компонентите, върху твърдата фаза, се прибавят белязани с ензим (ла в тестове за търсене на антигени, респективно вете за търсене на антитела).

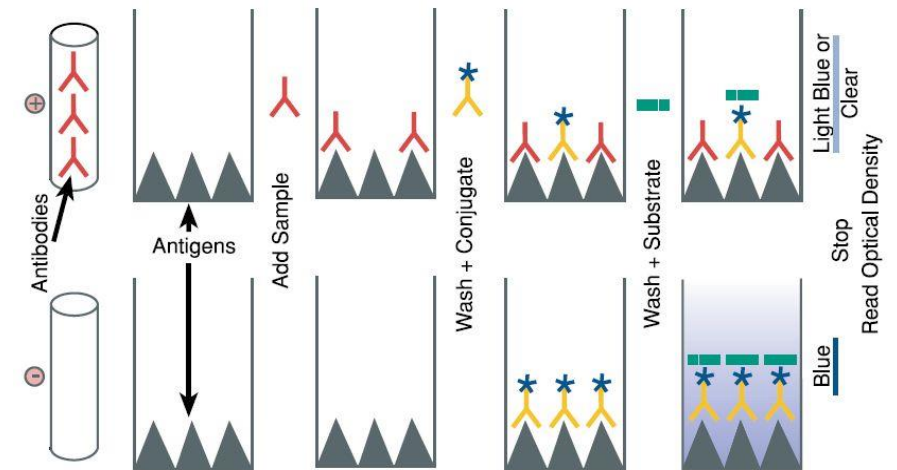
2. Антиглобулинов ИЕМ.

- ▶ Принципът на тази модификация е индиректен ИЕМ.
- ▶ С негова помощ в изследвания материал могат да се докажат антитела, които се свързват с антигените, нанесени върху твърдата фаза, с помощта на белязаното с ензим античовешко антитяло. Специфичността и чувствителността на метода зависят от качеството на антигените, имобилизирани върху твърдата фаза. С използването на различни комбинации от рекомбинантни антигени и синтетични пептиди основните характеристики на антиглобулиновия метод - чувствителност и специфичност, нарастват изключително много.



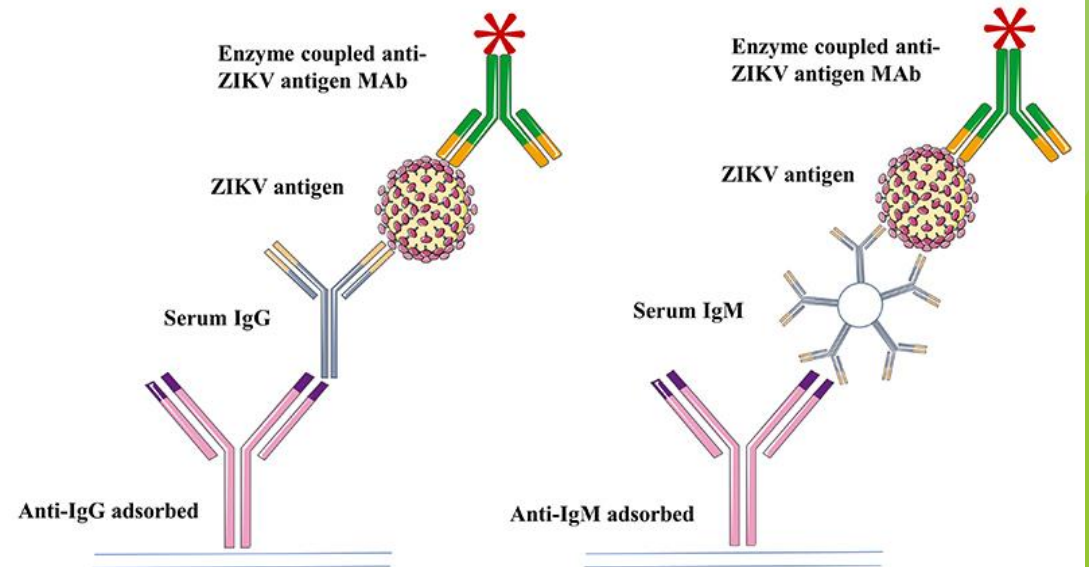
3. Конкурентен ИЕМ.

- ▶ При този метод белязаните с ензим антигени или антитела се конкурират с небелязаните такива от изследваните материали за свързването на определено количество антитела или антигени, нанесени върху твърдата фаза. При конкурентен ИЕМ ензимната активност е обратно пропорционална на концентрацията на търсеното вещество. Т.е. наличието на антигени или антитела в изследвания материал, свързани в комплекс антиген-антитяло с компонентите върху твърдата фаза, водят до липса на крайна цветна реакция.



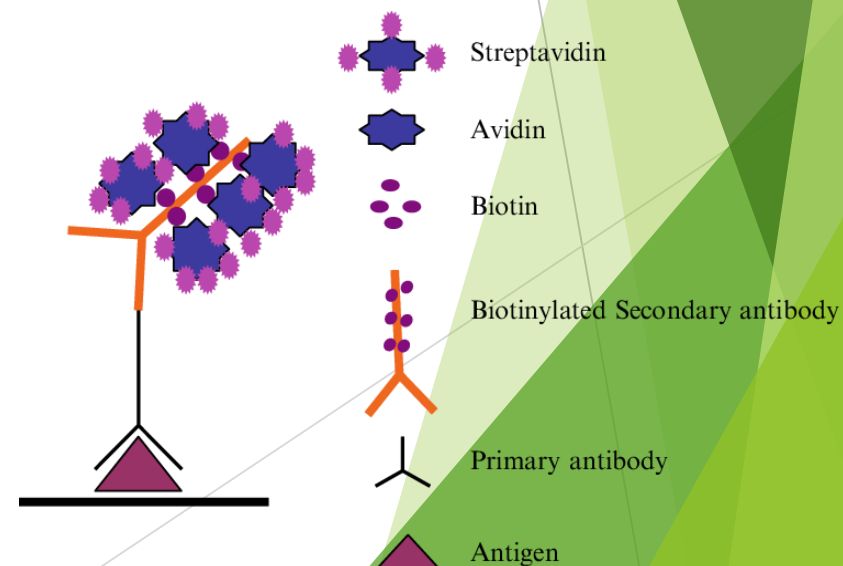
IgG и IgM capture метод

- ▶ Този метод е предназначен предимно за доказване на специфични IgG и/или IgM антитела в изследвания материал.
- ▶ Върху твърдата фаза се нанасят анти μ и/или анти γ антитела и специфични антигени. Образуваните комплекси се доказват с ензим специфични антигени.



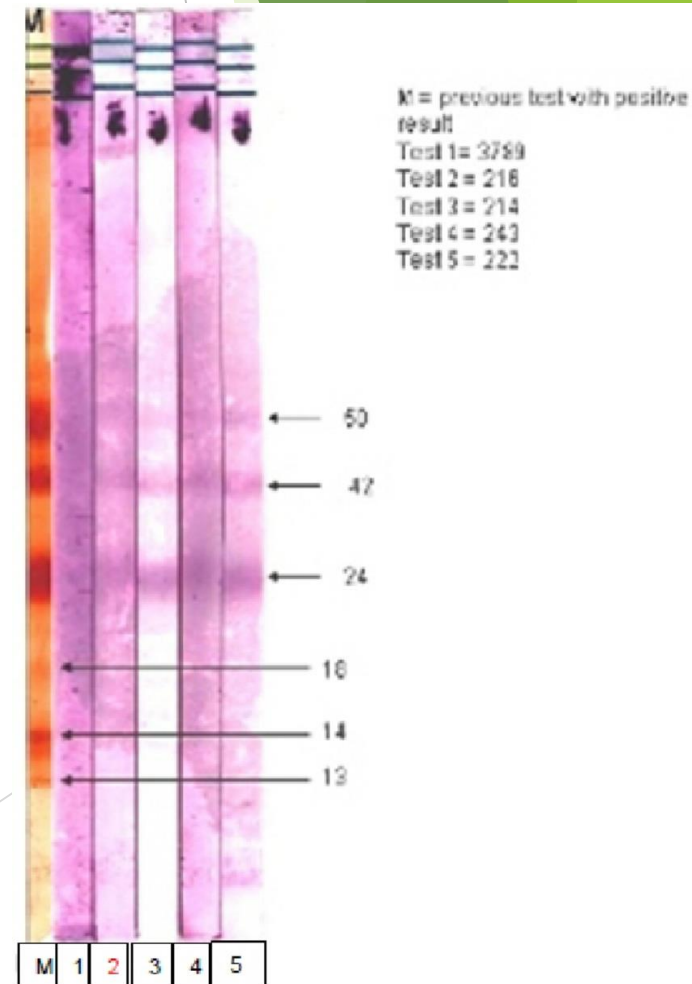
ИЕМ, включващи система авидин-биотин

- ▶ Най-важното преимущество на методите, включващите образуване на комплекс авидин-биотин се състои в това, че всяко вещество, конюгирано с биотин, може да бъде открито чрез взаимодействието с авидин, ковалентно или нековалентно свързан с един или друг индикатор. Съществено преимущество на тези методи е тяхната универсалност, която позволява те да се приспособят към практически всяка тест система.



Електрофоретичен метод, съчетан с ИЕМ (EITB)

- ▶ Това е метод за анализ на белтъци, съчетаващ преимуществата на три независими физикохимически метода. На първи етап се извършва електрофоретично разделяне на сложни смеси от биологични макромолекули с помощта на електрофореза в полиакриламиден гел. След това се извършва електрофоретичен пренос (електроблотинг) на разделените белтъци върху твърд носител. Последният етап включва визуализация на белтъците и реакцията антиген-антитяло с помощта на някоя от модификациите ИЕМ.
- ▶ На практиката този метод не се използва за скрининг. Основното му приложение в трансфузионната практика е да служи като допълнителен тест за наличие на анти HCV и анти HIV антитела в изследвания материал.



Контрол на основните параметри.

Преди въвеждане на нов ИЕМ за рутинна диагностика на дарената кръв следва да се изпитат основните характеристики на метода - чувствителност, специфичност и възпроизводимост.

- ▶ Чувствителността се изпитва с международни стандарти с известна концентрация (напр. Със стандартите на Институт Paul Ehrlich) с панели от слабо, средно и силно положителни проби и сероконверторни панели.
- ▶ Специфичността се определя чрез изпитване на голям брой проби, получени от здрави лица от популации с нисък риск за инфекции.
- ▶ Преценката на чувствителността и специфичността се извършва с помощта на две формули, при които се използват параметри, дадени в таблицата.

Истински статус на изследваната проба	Резултат от изследването			Общо
	положителен	граничен*	отрицателен	
положителен	а	б	в	а+б+в
отрицателен	г	д	е	г+д+е

* резултат в границите на 10% под и над граничната стойност (cutoff)

- ▶ Чувствителност на ИЕМ в % = $(а+б) : (а+б+в) \times 100$
- ▶ Специфичност на ИЕМ в % = $е : (г+д+е) \times 100$

ИЕМ

- ▶ Възпроизводството на ИЕМ се определя с панел от малък брой отрицателни, слабо, средно и силно положителни проби. За преценка на възпроизводимостта за едно изследване панелът се изследва многократно в рамките на едно зареждане на проби, а за тази между няколко последователни изследвания панелът се изследва по няколко пъти в няколко последователни дни. За всяка проба от панела се изчислява средната стойност на резултатите (представени като съотношения между оптичестката плътност на пробата и граничната стойност), стандартно отклонение и коефициент на вариация. Колкото по-нисък е този коефициент, толкова по-добри са качествата на изпитвания ИЕМ.

Автоматизация и компютеризация на ИЕМ

- ▶ Компютерризацията и автоматизирането на процесите на накапване, обработката на пробите и крайното отчитане на реакциите са от съществено значение за подобряване сигурността на кръвта. С тях се избягват най-често допусканите грешки при мануална работа като:
 - Технически грешки при идентификацията на пробите и пренос на информацията в документацията;
 - Грешки при накапване на проби и реагенти;
 - Технически грешки при извършване на пробите;
 - Грешки при отчитане на резултатите.

Автоматизирането подобрява изследвания на няколко нива:

- ▶ Накапване на пробите
- ▶ Идентификация на пробите или разположение на пробите на всяка стъпка
- ▶ Обработка на пробите съгласно точно определена процедура
- ▶ Отчитане на резултати
- ▶ Пряк пренос на резултатите към компютризирана информационна система

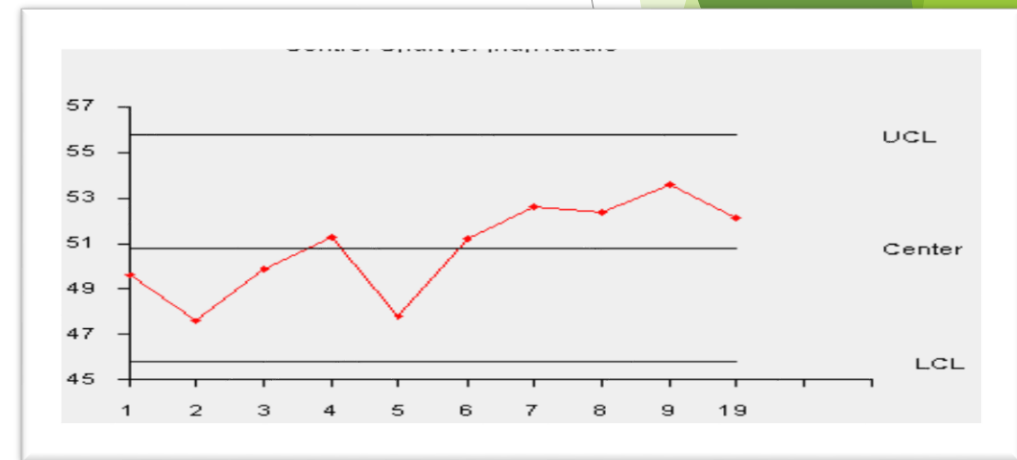
Компютеризацията на процесите дава следните преимущества:

- ▶ Връзка между идентификацията на единицата и пробата, както и връзката между идентификацията на единицата с документацията на дарителя;
- ▶ Пренос на резултатите от автоматизираната система към документацията на даряванията;
- ▶ Обновяване и поддържане на списъка на наличните кръвни продукти, отрицателни за маркери на трансмиссивни инфекции;
- ▶ Избягване на освобождаване на кръвни продукти, които не отговарят на спецификациите;
- ▶ Създаване на списъци на кръвни продукти, които подлежат на унищожение;
- ▶ Поддържане на списъци на унищожените кръвни продукти
- ▶ Подновяване на списъците на дарителите;
- ▶ Поддържане на информация за лабораторните изследвания.

Статистически контрол на процесите.

- ▶ В трансфузионната медицина приложението на СКП се препоръчва преди всичко при скрининг на дарената кръв. За мониторинг едно от средства за избор е изграждането на контролни графици, като между най-подходящите е тази на Shewart. С нея се изразяват отклоненията в избраните параметри (стойност на положителни и отрицателни контроли, cutoff, резултатите на вътрешни контроли) в границите на две до три стандартни отклонения.
- ▶ При изграждане на контролни графици се спазват няколко стъпки:
- ▶ 1. Набиране във времето на данни за контролирания параметър
- ▶ 2. Изчисление на статистическите данни.
- ▶ 3. Изчисление на статистическите контролни граници.
- ▶ 4. Изграждане на контролни графици.
- ▶ 5. Сравняване на нови данни с контролни граници.

- ▶ Определения:
- ▶ X_i - индивидуални измервания на даден параметър
- ▶ \bar{X} - средна аритметична стойност на индивидуалните параметри
- ▶ MR_i - абсолютна стойност от разликата между две последователни индивидуални измервания (наречена подвижна граница)
- ▶ \overline{MR} - средна аритметична сттойност между последователните измервания
- ▶ E_2 - фактор, изчислен от "нормалното разпределение"
- ▶ Формули:
- ▶ Средна линия = \bar{X}
- ▶ Горна контролна граница = $\bar{X} + E_2 * \overline{MR} = \bar{X} + 2.660 * \overline{MR}$
- ▶ Долна контролна граница = $\bar{X} - E_2 * \overline{MR} = \bar{X} - 2.660 * \overline{MR}$



ИНТЕПРЕТАЦИЯ

- ▶ Интерпритацията на данните от контролните графики дава възможност за осъществяването на контрол над всички процеси при използване на ИЕМ. Съществуват няколко основно правила, които насочват за настъпване на нежелано отклонение:
 1. Поредното измерване на контролния параметър е извън контролните граници.
 2. Седем последователни измервания на контролния параметър са разположени или над, или под средната линия.
 3. Седем последователни измервания са в посока увеличение или намаление.
- ▶ Установяването на отклонения или тенденция към отклонения са сигнал за предприемане на мерки за отстраняване на причините им. СКП е най-сигурният метод, чрез който може да се докаже, че предприетите мерки за подобряване на даден процес са постигнали желаните резултати.

БЛАГОДАРЯ ЗА ВНИМАНИЕТО

Д-Л Жанина Йорданова Иванова дм

