

## СТОИТ ЛИ ЭКОНОМИТЬ НА ДЕШЕВЫХ РЕАКТИВАХ?

Ройтман А. П. - доцент кафедры клинической лабораторной диагностики РМАПО  
Новикова Т. Е. - научный сотрудник ЗАО «Лахема Интернэшнл»

В настоящее время производители реактивов предлагают разнообразные наборы для клинической химии, основанные на разных аналитических принципах измерения, в том числе методом «конечной точки» и кинетическими методами.

Традиционные методы конечной точки основаны на образовании окрашенных продуктов реакции. Для субстратов окраска хромогена пропорциональна концентрации аналита, реакция продолжается, как правило, от 10 - 40 мин до полного исчерпания субстрата в реакционной среде. Для ферментов при регистрации методом конечной точки необходимо через фиксированный промежуток времени резко оборвать реакцию, используя при этом агрессивные реагенты - кислоты щелочи, спирты, альдегиды или их смеси. Из-за применения агрессивных реактивов такие методы не могут быть использованы на биохимических анализаторах и фотометрах с проточной кюветой, так как это приведет к повреждению приборов. Поэтому традиционные методы с регистрацией по конечной точке проводятся на фотокалориметрах. Однако на отечественных ФЭКах, оснащенных стеклянными кюветами, светофильтрами с широкой полосой пропускания и клиновидным способом компенсации световых потоков невозможно работать в ультрафиолетовом диапазоне (340 нм), вывести нужную длину волны (405, 540 нм) с высокой точностью и измерять изменение оптической плотности в широком диапазоне. Существенные трудности связаны с калибровкой при определении ферментов методом конечной точки, так как калибровка проводится по продукту ферментативной реакции, который независимо вносится в реакционную среду, а не по ферменту, который определяется в реакции. В частности, при определении активности трансаминаз (АлАТ, АсАТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) калибровка ведется путем приготовления нескольких разведений пировиноградной кислоты, при определении активности холинэстеразы - по уксусной кислоте, при определении активности  $\alpha$ -амилазы - по негидролизованному крахмалу. Контрольные сыворотки, используемые при проведении межлабораторного и внутрилабораторного контроля качества, как правило не аттестованы по данным методикам. В результате страдает качество результатов исследования. Обобщенные точностные характеристики, которые достигаются в зависимости от используемого оборудования, представлены в таблице 1.

Инструменты, методы	Субстраты	Ферменты
Стеклянные/автоматические пипетки, фотокалориметр, методы конечной точки	8 - 12 %	20 - 25 %
Полуавтоматический фотометр без термостата, методы конечной точки	4 - 7 %	15 - 20 %
Полуавтоматический фотометр с термостатом, кинетические методы	4 - 5 %	7 - 8 %
Биохимический автомат, моно/полихроматор, ротор < 20 позиций	4 - 5 %	4 - 5 %
Биохимический автомат, моно/полихроматор, ротор > 80 позиций	1 - 2 %	2 - 4 %

**Таблица 1.** Коэффициенты вариации, достигаемые при определении субстратов и ферментов в зависимости от используемого оборудования, условий проведения реакций и методических подходов

Примерами традиционных методов конечной точки являются: определение холестерина методом Илька, глюкозы - ортотолуидиновым методом, мочевины - по цветной реакции с диацетилмоноксидом, активности трансаминаз - методом Райтмана и Френкеля, активности  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы (ГГТ)- реактивом с  $\gamma$ -глутамил-4-нитроанилидом. Из-за низкой себестоимости реактивов, приборного парка и оплаты труда персонала лабораторий считается, что эти методы дешевы. Поэтому наборы для выполнения этих методов заказываются и покупаются. Спрос определяет предложение. Фирмы продолжают поставлять наборы для ручных методов конечной точки.

В целях повышения аналитической надежности лабораторных исследований Приказом №45 от 07.02.2000 г. Минздрав России рекомендовал использовать в качестве перспективных (желательных) нормативов аналитической точности предельно допустимые значения (ПДЗ) общей вариации результатов клинических лабораторных исследований. Исходя из ПДЗ, целевое значение коэффициента общей аналитической вариации не должно превышать 1/2 коэффициента внутрииндивидуальной вариации или 1/4 коэффициента межиндивидуальной биологической вариации, представленных в международном банке данных (Sebastian-Gambaro et al. Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem., 1997, 35, 11, 845-852). «Желательные» коэффициенты аналитической точности определения биохимических аналитов представлены в таблице 2.

Субстраты	CV, %	Ферменты	CV, %
Альбумин	< 1,4	$\alpha$ -Амилаза	< 4,3
Белок общий	< 1,3	АсАТ	< 5,8
Билирубин общий	< 11,0	АлАТ	< 11,5
Глюкоза	< 3,0	ГГТ	< 6,1
Креатинин	< 2,1	Кислая фосфатаза	< 3,6
Кальций	< 2,3	Креатинкиназа	< 14,1
Мочевина	< 3,6	ЛДГ	< 3,6
Триглицериды	< 11,0	Холинэстераза	< 2,7
Холестерин	< 2,6	Щелочная фосфатаза	< 2,9

**Таблица 2.** Целевое (желательное) значение коэффициентов общей аналитической вариации для наиболее распространенных аналитов сыворотки крови человека.

Увеличение точности определения биохимических параметров сыворотки имеет не только аналитический интерес. Низкая чувствительность определения аналитов существенно уменьшает ценность лабораторной диагностики, уменьшает клинко-диагностическую эффективность лабораторных исследований. В частности, методы конечной точки для АсАТ и АлАТ нечувствительны, они способны выявить патологические изменения только при обширных повреждениях органов и тканей, поэтому во многих случаях диагностика запаздывает, при реконвалесценции больных выписывают раньше, чем происходит выздоровление, что зачастую обосновывается нормализацией активности ферментов, хотя патологический процесс еще сохраняется. В результате из-за несвоевременного прекращения лечения происходит хронизация патологического процесса. Так, определение активности  $\alpha$ -амилазы по Каравею (методом конечной точки) очень редко выявляет патологические изменения даже при подтвержденном панкреатите. Поэтому экономия при работе на морально устаревших ФЭКах не оправдана, так как это приводит к снижению эффективности диагностики и удорожанию лечебного процесса в целом из-за несвоевременного выявления и плохого контроля за течением заболеваний.

Необходимо стремиться определять биохимические показатели сыворотки крови на биохимических анализаторах или термостатируемых фотометрах, используя

кинетические методы регистрации. Наиболее перспективным представляется использование жидких, полностью готовых к применению диагностических наборов. Основной характеристикой жидких стабилизированных реактивов является: повышенная стабильность, отсутствие подготовительной стадии, возможность хранить рабочий раствор как угодно долго, что обеспечивает использование реактива полностью. Эти особенности жидких реактивов существенны особенно для малых и средних лабораторий, в которых количество определений по тому или иному биохимическому показателю бывает небольшим в день, для которых стабильность является одним из ключевых факторов (таблица 3). Отсутствие стадии разведения (что необходимо для лиофилизированных реактивов) также не менее важный фактор, это полностью исключает ошибки, связанные с некачественной водой и погрешностями посуды. Такой подход позволит обеспечить должный уровень точности и чувствительности.

Жидкие формы	Стабильность рабочего раствора	Лиофилизированные формы	Стабильность рабочего раствора
$\alpha$ -Амилаза AMS (EPS LIQUID) 200	12 месяцев (2-8) <sup>0</sup> С в темном месте	$\alpha$ -Амилаза СТ 105 AMS СТ 7x15	3 недели (2-8) <sup>0</sup> С, в темном месте
Глюкоза оксидазный FS GLU FS	18 месяцев (2-8) <sup>0</sup> С в темном месте	Оксохром глюкоза С GLU 250 ES	1 месяц (2-8) <sup>0</sup> С в темном месте
Холестерин ферм. FS CHOL FS	18 месяцев (2-8) <sup>0</sup> С в темном месте	Оксохром холестерин 250 CHOL 250 E	7 дней(2-8) <sup>0</sup> С, в темном месте
Мочевая кислота FS UA FS	3 недели (2-8) <sup>0</sup> С, в темном месте	Оксохром мочевая кислота UA 105E	2 дня (2-8) <sup>0</sup> С, в темном месте
Кальций FS Ca L 1x250	12 месяцев (2-8) <sup>0</sup> С в темном месте	Кальций КХ Ca 100 КХ	2 дня (2-8) <sup>0</sup> С, в темном месте
Фосфор FS P L 1x250	12 месяцев (2-8) <sup>0</sup> С в темном месте	Фосфор P 80	ежедневно свежий

**Таблица 3.** Стабильность рабочего раствора диагностических наборов

### **Преимущества использования кинетических ферментных методов в клинической химии:**

1. Резко уменьшается объем реакционной смеси (100-300 мкл в современных анализаторах, 400-1000 мкл в термостатируемых фотометрах и  $\approx$  3500 мкл у ФЭКа), соответственно снижается объем сыворотки или другой биожидкости, уменьшается стоимость реактивов.
2. Измерение происходит за 2 - 5 минут, что принципиально для отделений реанимации и интенсивной терапии.
3. Не используются агрессивные среды, практически исчезают условия для возникновения у персонала аллергических реакций.
4. Кинетические методы более чувствительны, чем методы конечной точки, они раньше выявляют патологию, значения аналитов при их использовании возвращаются к норме при истинном выздоровлении, при патологии они дают большую кратность изменений по отношению к норме.
5. На анализаторах регистрация проходит фактически в автоматическом режиме.

6. Активность ферментов оценивается по коэффициентам молярной абсорбции продукта (субстрата или кофактора реакции), то есть без калибровки.
7. Легко выявляются нарушения линейности протекания реакции, то есть возможные погрешности аналитической стадии.
8. При высокой активности фермента можно проследить истощение субстрата в ходе реакции и повторить реакцию при разведении образца.
9. Фермент находится практически в одинаковых условиях при протекании всего процесса измерения (пробы не переливаются из пробирки в пробирку), что существенно влияет на стабильность результатов.
10. В наборах реагентов для кинетических исследований как правило используются более чистые реактивы, в которых отсутствуют ингибиторы ферментов.
11. Контроль качества проводится по любой внутри- и межлабораторной системе, так как имеется много аттестованных по этим методам контрольных сывороток.
12. Из-за лучших аналитических характеристик практически не требуется повторных измерений и перепроверки результатов.

Для сопоставления финансовых затрат при применении традиционных методов конечной точки и современных кинетических методов нами проведен сравнительный анализ реагентов фирмы Лахема. Ассортимент тест-наборов которой наиболее широк и включает как наборы по конечной точке, поставляемые в Россию на протяжении нескольких десятков лет, так и современные кинетические ферментные наборы, и наборы жидкие, стабилизированные, готовые к непосредственному применению. Результаты расчетов стоимости биохимических исследований некоторых аналитов, основанные на прескуранте-2000 АО «Lachema», при определении на ФЭКе с объемом реакционной кюветы 3,5 мл; на термостатируемом фотометре (объем измерительной кюветы 1000 мкл); на термостатируемом фотометре с проточной кюветой (объем измерительной кюветы 400 мкл) и на биохимическом анализаторе с объемом измерительной кюветы 250 мкл, представлены в таблице 4.

Метод конечной точки		Кинетический метод			
Название набора	Стоимость, USD	Название набора	Стоимость, USD		
	1 измерения ФЭК		1 измерения кювета 1000 мкл	1 измерения кювета 400 мкл	1 измерения кювета 250 мкл
<b>Аланинаминотрансфераза (АлАТ)</b>					
ALT 360	0,032	ALT 4*50UV	0,1162	0,0465	0,0291
<b>Аспартатаминотрансфераза (АсАТ)</b>					
AST 360	0,032	AST 4*50UV	0,1162	0,0465	0,0291
<b>α-Амилаза</b>					
AMS 50	0,45	AMS (EPS LIQUID) 200	0,6420	0,2570	0,1605
<b>γ-Глутамилтрансфераза</b>					
GGT 100	0,2068	GGT 100 KIN	0,1377	0,0551	0,0344
<b>Креатинкиназа</b>					
CK 50	0,4322	CK NAC 10*10	0,3917	0,1567	0,0979
<b>Лактатдегидрогеназа</b>					
LD 50	0,5434	LD 105 UV	0,1191	0,0477	0,0298

<b>Мочевина</b>					
UREA 450	0,0411	UREA UV KIN 4*50	0,2552	0,1020	0,0638
<b>Холинэстераза</b>					
CHE 50	0,14	CHE 50	0,07	0,0350	0,0116
<b>Щелочная фосфатаза</b>					
ALP 120	0,3412	ALP 120	0,0854	0,03412	0,0214

**Таблица 4.** Сравнение стоимости измерений аналитов методом конечной точки традиционными наборами и методом кинетики ферментными наборами.

Сравнительный анализ показывает, что практически для всех биохимических показателей экономически выгоднее исследовать содержание метаболитов и активность ферментов на биохимических анализаторах или термостатируемых фотометрах, используя кинетические методы, чем на ФЭКах методами конечной точки, причем экономия достаточно существенная. Если учесть, что производительность на биохимических анализаторах и полуавтоматических фотометрах значительно выше, уменьшается количество повторных исследований, то при адекватной нагрузке переход на современные технологии сопровождается реальной экономией материальных средств, улучшением качества, убыстрением анализов, повышением клинико-диагностической эффективности лабораторных исследований. Таким образом, «экономить» на дешевых реактивах невыгодно: ни с экономической, ни с аналитической, ни с диагностической целью.