

использования в лабораторной диагностике аденовирусных инфекций.

Работа была выполнена в рамках комплексной научно-технической программы НАН Украины “Сенсорные системы для медико-экологических и промышленно-технологических потребностей”

ЛИТЕРАТУРА

1. Аденовирус, клетка, организм / Н.С. Дяченко, И. Нас, Д. Беренчи, Л.Н. Носач, Н.П. Ванцак, Л.А. Тарасишин, Е. Адам. — К.: Наук. думка, 1988. — 232 с.
2. Болтовець П. М., Нестерова Н. В. Застосування методу поверхневого плазмонного резонансу у вірусологічних дослідженнях // Мікробіол. журн. — 2006. — Т. 68, № 3. — С. 86–99.
3. Виявлення антиаденовірусних антитіл методом поверхневого плазмонного резонансу / Л.М. Носач, П.М. Болтовець, С.Д. Загородня, О.Ю. Повниця, А.В. Головань, Н.І. Нетреба, Л.І. Добровичинська // Укр. біохім. журнал. — 2009. — Т. 81, № 4. — С. 39–47.
4. Дослідження взаємодії антиген-антитіло аденовірусу людини методом поверхневого плазмонного резонансу / Л.М. Носач, П.М. Болтовець, О.Ю. Повниця, В.Л. Жовновата, О.М. Захаренко, Б.А. Снопко, Ю.М. Ширишов, Н.С. Дяченко // Мікробіол. журнал. — 2005. — Т. 67, № 4. — С. 58–64.
5. Експресна діагностика лейкозу великої рогатої худоби за допомогою імунного сенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу / Л.В. Пирогова, М.Ф. Стародуб, В.П. Артюх та ін. // Укр. біохім. журнал. — 2002. — Т. 74, № 3. — С. 88–92.
6. Detection of human serum antibodies against type-specifically reactive peptides from the N-terminus of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 and 2 by surface plasmon resonance / C. Wittekindt, B. Fleckenstein, K. Wiesmüller, et al. // J. Virol. Methods. — 2000. — Vol. 87. — P. 133–144.
7. Elaboration of optical immunosensors based on the surface plasmon resonance for detecting specific antibodies and antigens of Epstein-Barr virus and human adenovirus / N.V. Nesterova, L.N. Nosach, S.D. Zagorodnya, O.Yu. Povnytsa, P.M. Boltovets, G.V. Baranova, A.V. Golovan // Мікробіол. журн. — 2008. — Т. 70, № 6. — С. 67–73.
8. Gomara M.J., Ercill G., Alsina M.A., Haro I. Assessment of synthetic peptides for hepatitis A diagnosis using biosensor technology // J. Immunol. Methods. — 2000. — Vol. 246. — P. 13–24.
9. Leen A.M., Rooney C.M. Adenovirus as an emerging pathogen in immunocompromised patients // Br. J. Haematol. — 2005. — Vol. 128. — P. 135–144.
10. Ramsden J. Optical biosensors // J. Molec. Recogn. — 1997. — № 10. — P. 109–120.
11. Surface plasmon resonance (BIACORE) detection of serum antibodies against Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium / B.G. Jongerius-Gortemaker, R.L. Goverde, A.A. Bergwerff et al. // J. Immunol. Methods. — 2002. — Vol. 266. — P. 33–44.
12. Walls T., Shankar A.G., Shingadia D. Adenovirus: an increasingly important pathogen in pediatric bone marrow transplant patients // Lancet. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 3. — P. 79–86.
13. Wang W.H., Wang H.L. Fulminant adenovirus hepatitis following bone marrow transplantation. A case report and brief review of the literature // Arch. Pathol. Lab. Med. — 2003. — Vol. 127. — P. 246–248.

ЛАБОРАТОРНО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ВИПРОБУВАННЯ ІМУНОСЕНСОРНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ДО АДЕНОВІРУСІВ ЛЮДИНИ

Н.В. Нестерова, С.Л. Рыбалко, Л.М. Носач, О.Ю. Повниця, С.Д. Загородня, Г.В. Баранова, А.В. Головань

Розроблені експериментальні серії імунодатчиків на основі приладу “Плазмон 6” для експресної діагностики антитіл до аденовірусів в сироватках крові людей. Проведені лабораторно-експериментальні випробування зразків імуносенсорної тест-системи показали, що вона є досить ефективною, специфічною і може бути використана при діагностиці хвороб, обумовлених цим вірусом.

LABORATORY EXPERIMENTAL EXAMINATION OF IMUNOSENSORY TEST-SYSTEM FOR DETECTION OF ANTIBODY TO HUMAN ADENOVIRUSES

N.V. Nesterova, S.L. Rybalko, L.M. Nosach, O.Yu. Povnytsa, S.D. Zagorodnya, G.V. Baranova, A.V. Golovan

Developed a series of experimental immunosensors based on device “Plasmon 6” for rapid diagnosis of antibodies to adenoviruses in the human serum. Conducted laboratory and pilot testing of the samples immunosensory test system showed that it is quite effective, specific and can be used to diagnose diseases caused by this virus.

УДК 577.21:616-074

Л.М. Александрова,¹ С.И. Беленец,¹
Т.А. Габур,¹ Е.Ю. Аристова,²
Л.С. Гаврилюк,² А.Л. Дробина,²
В.О. Бузыревский²

КРЕАТИНИН. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

¹ “Реагент”, г. Днепропетровск,
² Городская больница № 7, г. Днепродзержинск

Креатинин — производное креатина, образующегося при его дегидратации, т. е. когда в мышечной ткани происходит разрушение макроэнергетического вещества креатинфосфата с выделением утилизируемой сократительными волокнами порции энергии, остатка неорганического фосфора и молекулы воды. Креатинин, будучи беспороговым веществом, выделяется с мочой.

Повышение содержания креатинина в крови наблюдается при: нарушении функции почек

(острая и хроническая почечная недостаточность), мочекаменной болезни.

Методы определения креатинина. Известные к настоящему времени способы определения содержания креатинина могут быть подразделены на две основные группы: 1) неферментативные (колориметрические и кинетические, базирующиеся главным образом на цветной реакции Яффе — образования окрашенного комплекса пикрата креатинина в сильно щелочной среде) и определения энзиматические.

В лабораториях Украины доминируют методы неферментативного определения креатинина, т. е. с депротеинизацией (модификация Поппера) пикриновой кислотой или трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и кинетический (без осаждения) метод определения.

В качестве депротеинизирующего средства могут выступать: перенасыщенный раствор пикриновой кислоты, ТХУ и вольфрамат натрия. Наиболее качественным осадителем считается сама пикриновая кислота, вернее ее перенасыщенный раствор. Но известно, что глюкоза, другие восстановители и белок при нагревании способны восстанавливать пикриновую кислоту в пикраминовою, мало отличающуюся по цвету от пикрата креатинина, а следовательно — оказывать интерферирующий эффект.

ТХУ в качестве осадителя стоит на втором месте, после перенасыщенного раствора пикриновой кислоты, так как она не осаждает “псевдокреатининовые” хромогены, к которым относятся: глюкоза, ацетон, ацетоуксусная и пировиноградная кислоты и другие соединения. Эти продукты могут обуславливать кажущееся повышение уровня сывороточного креатинина.

Третье место в качестве осадителя занимает вольфрамат натрия.

В кинетических методах, образование цветного комплекса, идет без предварительной депротеинизации. В этом случае, необходимо точно выдерживать временной интервал между измерением проб. Температурный режим важен в целом, т. е. и опытные и калибровочные пробы при определении, выдерживаются при одной и той же температуре. Но иногда кинетический метод называют еще псевдокинетическим, из-за того, что пробы можно инкубировать и при температуре 37°C и выдерживать при температуре 25 °С. Поэтому креатинин кинетически определяется и на анализаторах, и на обычных фотометрах.

Линейность методик. Линейность метода по многим литературным данным — от 0 до 360 мкмоль/л или до 442 мкмоль/л [1–3]. Практически установленный диапазон линейности для растворов калибраторов по любой методике измерения — от 20 до 1500 мкмоль/л и даже выше.

Для сравнения линейности разных методик определения креатинина был взят набор калибраторов “На весь диапазон линейности” (производитель “Реагент”, г. Днепропетровск).

Но при работе с биологическими пробами, где концентрация 900 мкмоль/л и выше, показатели полученные кинетическими методами определения и методами с депротеинизацией будут существенно отличаться.

Коэффициент пересчета между методами. Коэффициент пересчета по контрольным материалам “Биоконтур С” с кинетического метода на метод с депротеинизацией составляет — 1,33; коэффициент пересчета по контрольным материалам “Лионорм” с кинетического метода на метод с депротеинизацией составляет — 1,34. Если округлить и усреднить, то получим значение коэффициента — 1,34.

Этот коэффициент подтверждается и при работе с человеческой сывороткой крови. Было параллельно проанализировано 10 проб кинетическим методом (тест-набор “Определение креатинина по реакции Яффе кинетическим методом”, фирма-производитель “Реагент”, Днепропетровск) и те же пробы методом с депротеинизацией ТХУ (тест-набор “Определение креатинина методом Яффе–Поппера с депротеинизацией ТХУ”, фирма-производитель “Реагент”, Днепропетровск). Результаты приведены в табл. 2

Таблица 1

Концентрация, мкмоль/л	Средняя экстинция, единиц оптической плотности		
	Метод с депротеинизацией пикриновой кислоты	Метод с депротеинизацией ТХУ	Кинетический метод, дельта
44,2	0,004	0,021	0,0035
88,4	0,007	0,042	0,007
176,8	0,014	0,084	0,014
442,0	0,035	0,205	0,035
600,0	0,048	0,285	0,0475
900,0	0,071	0,427	0,071
1500,0	0,118	0,712	0,118

Таблица 2

№ сыворотки	Концентрация по кинетическому методу, мкмоль/л	Концентрация по методу с депротеинизацией ТХУ, мкмоль/л	Коэффициент
1	205	297,25	1,45
2	82	113,98	1,39
3	605	907,50	1,50
4	99	131,67	1,33
5	110	176,00	1,60
6	366	475,80	1,30
7	67	86,43	1,29
8	276	400,20	1,45
9	157	196,25	1,25
10	90	126,00	1,40
Среднее значение коэффициента			1,396

Особенности метода Яффе–Поппера с депротеинизацией пикриновой кислотой. Самый трудоемкий и точный метод. Включающий этапы центрифугирования (1000–1500 об./мин) или фильтрования, погружение на несколько секунд в кипящую водяную баню. Для измерения экстинции подходит любое фотометрическое оборудование, где есть длина волны — 540 нм. Особенностью этой методики является тот факт, что допустимо и центрифугирование, и фильтрование. При центрифугировании значения будут ниже, чем при фильтровании. При центрифугировании интервал нормы совпадает с нормой для кинетического метода и с нормой по унификации. При фильтровании — с нормами для методики с депротеинизацией ТХУ. При проверке контрольной сывороткой для вхождения в интервал нормы “с депротеинизацией” необходимо умножить на коэффициент 1,34 (если пробы центрифугируются). При проверке контрольной сывороткой для вхождения в интервал нормы “с депротеинизацией” умножить на коэффициент 1,34 не нужно (если пробы фильтруются).

Особенности метода Яффе–Поппера с депротеинизацией ТХУ. Необходимо также центрифугирование, но без кипячения. Рекомендуется центрифугировать не менее 20 мин на оборотах не ниже 3000 об./мин, но выдерживать при комнатной температуре (смотреть методику) после добавления щелочи с пикриновой кислотой 5 мин. Для измерения экстинции подходит фотометрическое оборудование, где есть длина волны — 500–510 нм (не 540 нм!).

Особенности кинетического (псевдокинетического) метода по реакции Яффе. Методика

очень простая, не требующая осаждения. Анализируемую жидкость добавляют в рабочий раствор, который делают смешиванием пикриновой кислоты и раствора щелочи в соотношении 3:1. Затем делают 2 измерения опытной или калибровочной пробы через 30 и 90 сек после начала отсчета. Вычисляют разницу в значениях оптической плотности ($\Delta A = A_2 - A_1$), расчет ведут по формуле. Для измерения экстинции подходит фотометрическое оборудование, где есть длина волны — 500–510 нм. Термостатирование при 37 °С — не обязательно.

Если первые два метода пригодны только для работы на фотометрах, то кинетический метод может быть использован как на фотометрах без термостатирования, с термостатируемой кюветой, так и для работы на биохимических анализаторах.

Возможных ошибки при определении креатинина:

1. Неправильная подготовка пациента к сдаче крови.

2. Вещества, отрицательно и положительно влияющие на интерференцию:

- *соединения влияющие на повышение концентрации аналита в организме (клиническая интерференция):* нефротоксические препараты — металлы (сурьма, мышьяк, висмут, кадмий, медь, золото, железо, свинец, литий, ртуть, серебро, таллий, уран); обезболивающие препараты (ацетоминифен, аминопирин) нестероидные противовоспалительные (ибупрофен, индометацин, напроксен, фенпрофен фенацетин, фенилбутазон, салицилаты), антибиотики (аминогликозиды — амикацин, гентамицин, канамицин, неомицин, стрептомицин, тобрамицин), амфетирицин В, капреомицин, цефалоспорины (цефалоридин и цефалотин), колистин, котримоксазол, фоскарнет, пенициллины, полимиксин В, рифампин, сульфаниламиды, тетрациклины, ванкомицин), противоопухолевые (цисплатина, циклофосфамид, ифосфамид, метотрексат, митомицин, нитрозмочевины (ломустин, семустин), пликамицин, стрептозоцин; органические растворители (бензол, углерода тетрагидрид, этиленгликоль, тетрагидроэтилен); прочие (ацетазоламид, аминакапроновая кислота, аминосалициловая кислота, борная кислота, каптоприл, циклоспорин, декстран, фуросемид, маннитол, метоксифлюран, пеницилламин, пентамидин, фениндион, хинин, рентгеногра-

фические контрастные вещества, тиазиновые диуретики, триамтерен, зоксазоламин);

- *соединения влияющие на химическую реакцию в процессе исследования, вызывающие повышение значений результата (химическая интерференция):* ацетоуксусная кислота, ацетогиксамид, ацетон, аскорбиновая кислота, цефаклор, цефамандол, цефазолин, цефоранид, цефокситин, цефалотин, флуцитозин, лидокаин, фруктоза, глюкоза, ибупрофен, леводопа, метилдофа, нитрофурантоин и пиперациллин, пролин, пируват, мочева кислота;
- *соединения влияющие на химическую реакцию в процессе исследования, вызывающие понижение значений результата:* п-ацетилцистеин, билирубин, цефалотин, дипирон, гемоглобин. Понижение значений креатинина может наблюдаться в липемической сыворотке.

3. Ошибки при заборе материала (гемолизи-
рованная сыворотка).

4. Оборудование.

Для каждого метода определения креатинина необходимо оборудование строго соответствующее методики. Так же для определение важна температура помещения $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Наличие стабилизатора напряжения для оборудования (особенно в зимний период, когда сеть перегружена электрообогревателями).

5. Реактивы.

Хранение:

- *пикриновую кислоту* хранят при комнатной температуре в темном месте или темном флаконе;

- *раствор щелочи* хранят в герметически закрытой пластиковой посуде при комнатной температуре;
- *раствор ТХУ* хранят при комнатной температуре в темном стекле;
- *растворы калибраторов* хранят только при температуре $2-8^\circ\text{C}$.

6. Ошибки при проведении методик:

- при отборе центрифугата попадание осадка;
- неправильно выбранная длина волны;
- окрашенный реакционный раствор — неустойчивый, поэтому фотометрирование нужно проводить немедленно;
- при центрифугировании неправильно выбранное количество оборотов (увеличение времени центрифугирования не компенсирует количество оборотов!).

7. Субъективный фактор — неотработанная методика лаборантом или желание по концентрации мочевины выставить креатинин.

8. Контрольный материал, по которому проверяется методика, должен соответствовать всем требованиям хранения, сроку годности и аттестации соответствующего метода. Постановка контрольных проб должна совпадать с калибровочными пробами по длине волны, объемам реактивов, оборудованию. Так же нужно учитывать особенности методики с депротеинизацией перенасыщенным раствором пикриновой кислоты.

Возрастной интервал нормы по разным методам определения. При выведении норм для разных методов (с депротеинизацией и без) коэффициент пересчета, как правило, не учитывают.

Таблица 3

Возрастная шкала норм для кинетического метода и метода с депротеинизацией пикриновой кислотой (с центрифугированием)

Возрастной интервал	Кинетика, мкмоль/л
Кровь из пуповины	47–90
Новорожденные, 1–4 дня	24–80
Дети до года	16–32
Дети	24–56
Подростки	40–80
18–60 лет:	
мужчины	72–104
женщины	47–88
60–90 лет:	
мужчины	64–104
женщины	47–88
более 90 лет:	
мужчины	80–136
женщины	47–104

Таблица 4

Возрастная шкала норм для метода с депротеинизацией ТХУ и метода с депротеинизацией пикриновой кислотой (с фильтрованием)

Возрастной интервал	Кинетика, мкмоль/л
Кровь из пуповины	63–120
Новорожденные, 1–4 дня	32–106
Дети до года	21–42
Дети	32–74
Подростки	53–106
18–60 лет:	
мужчины	96–138
женщины	63–117
60–90 лет:	
мужчины	85–138
женщины	63–120
более 90 лет:	
мужчины	106–181
женщины	63–138

Таблица 5

**Возрастная шкала норм
по данным энциклопедии Тица**

Возрастной интервал	Кинетика, мкмоль/л
Кровь из пуповины	53–106
Новорожденные, 1-4 дня	27–88
Дети до года	18–35
Дети	27–62
Подростки	44–88
18–60 лет:	
мужчины	80–115
женщины	53–97
60–90 лет:	
мужчины	71–115
женщины	53–106
более 90 лет	
мужчины	88–150
женщины	53–115

Но на практике, при определении креатинина методом с депротеинизацией ТХУ видно, что нормы должны быть выше.

ВЫВОДЫ

Определение креатинина и его нормы, как и любого другого анализа, должно быть отработано для условий данной лаборатории. Прежде чем выбирать метод определения необходимо учитывать оборудование лаборатории (наличие кондиционера, стабилизатора напряжения и т. д.). Необходимо знать какое влияние оказывает химиотерапия на креатинин и как соот-

носятся величины полученные двумя разными методами определения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Камышиников В.С. *Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике.* — М.: МЕДпресс-информ, 2004.
2. *Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Под ред. Н. Тица.* — М.: Лабинформ, 1997.
3. *Laboratory news.* — 2008, December 4. — Vol. 31, № 8.

КРЕАТИНІН. МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ ТА МОЖЛИВІ ПОМИЛКИ

*Л.М. Александрова, С.І. Біленець, Т.А. Габур,
О.Ю. Аристова, Л.С. Гаврилюк, А.Л. Дробіна,
В.О. Бузиревський*

Робота присвячена аналізу типових помилок при визначенні креатиніну. Для допомоги лабораторіям України була зібрана, оброблена та систематизована інформація по визначенню цього аналіту. Розглянуто питання щодо атестатів контрольних сироваток для різних методів визначення креатиніну. В роботі пропонуються норми креатиніну за віком. Пояснюється різниця в результатах аналізу, отриманих різними методами визначення.

CREATININE. METHODS OF DETECTION AND POSSIBLE ERRORS

*L.M. Aleksandrova, S.I. Bilenets, T.A. Habur,
Ye. Yu. Aristova, L.S. Gavrilyuk, A.L. Drobina,
V.O. Buzirevskiy*

Work blessed analysis of typical errors in the determination of creatinine. To help laboratories of Ukraine was collected, processed and classified information to determine the analyte. The questions on the examination methods for detection of creatinine in control sera. The paper proposed rules creatinine by age. Explained by differences in the results — of analysis obtained by different methods of determination.