УТВЕРЖДЕНЫ
Постоянным комитетом
по контролю наркотиков
10 сентября 1997 г.,
протокол N 6/60-97

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПОЛЯРИЗАЦИОННОМУ ФЛУОРОИММУНОАНАЛИЗУ НАРКОТИЧЕСКИХ И ОДУРМАНИВАЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В МОЧЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ НА TDx-, FLx-АНАЛИЗАТОРАХ ФИРМЫ "ABBOTT" <*>

<*> Разработчики: А.В.Смирнов, Б.Н.Изотов, С.Б.Лисовская (ММА им. И.М.Сеченова).

В основе настоящих методических указаний лежит метод поляризационного флуороиммуноанализа (ПФИА), который является одним из современных и перспективных видов иммуноанализа. Главные его достоинства - экспрессность, высокая чувствительность и специфичность, малое количество исследуемого образца, отсутствие стадии пробоподготовки, полная автоматизация качественного и количественного анализа. За рубежом ПФИА хорошо известен и широко используется как для мониторинга лекарственных средств, так и в контроле за употреблением наркотических и одурманивающих веществ. В качестве объектов для исследования используются моча и сыворотка крови пациентов.

Фирмой "ABBOTT" выпускается около 20 различных видов наборов для ПФИА наркотических и одурманивающих веществ в моче: амфетамины (группа веществ), барбитураты (груп.), бензодиазепины (груп.), каннабиноиды (груп.), опиаты (груп.), трицикл. антидепрессанты (груп.), амфетамин/метамфетамин, амитриптилин, дезипрамин, имипрамин, карбамазепин, кокаина метаб., котинин, метадон, нортриптилин, пропоксифен, фенобарбитал, фенциклидин, этанол.

В Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова сотрудниками Центральной химико - токсикологической лаборатории разработаны и используются в исследовательских целях аналогичные наборы для ПФИА: амфетамины (груп.), барбитураты (груп.), бензодиазепины (груп.), каннабиноиды (груп.), опиаты (груп.), амфетамин/метамфетамин, барбамил, диазепам, кокаина метаболит (бензоилэкгонин), метадон, метамфетамин, фенобарбитал, фенциклидин, эфедрин. Данные наборы реагентов рекомендуются к использованию в диагностических целях для количественного определения наркотических веществ в моче и сыворотке крови.

ПФИА является гомогенным конкурентным методом иммуноанализа, основанным на конкуренции меченого флуоресцентным красителем антигена (трейсера) с немеченым антигеном (в исследуемом образце) за ограниченное количество центров связывания антител. Концентрация анализируемого вещества в пробе определяется степенью связывания трейсера с антителом. Образование такого иммунного комплекса устанавливается путем измерения поляризации флуоресценции, в частности, на TDx-, FLx-анализаторах фирмы "ABBOTT".

При химико - токсикологическом анализе наркотических и одурманивающих веществ метод ПФИА используют как при скрининге, так и при направленном анализе образцов. В случае проведения скрининга образцов при получении положительного результата, т. е. когда концентрация анализируемого вещества превышает пороговую концентрацию (Cut-off), требуется провести дальнейшее исследование образца мочи подтверждающими альтернативными методами: ГХ/МС, ГЖХ, ВЭЖХ. При отрицательном результате не требуется проведение дальнейшего исследования на данное анализируемое соединение или группу веществ.

Метод включает следующие стадии:

- калибровка;
- анализ образцов мочи.
Методические указания предназначены для использования в химико - токсикологических лабораториях наркологических больниц и наркодиспансеров, в химических лабораториях бюро судебно - медицинских экспертиз, в лабораториях других учреждений, связанных с анализом средств, вызывающих наркотическое опьянение.
Настоящие методические указания могут использоваться наряду со справочным руководством "Анализ наркотических средств" (М., 1993), авторами которого являются С.К.Еремин, Б.Н.Изотов, Н.В.Веселовская, и руководствами для анализа "TDx-system Assays II" и "TDx-system operation manual" (Abbott Laboratories, living. Texas. USA. 1985).
Оборудование и материалы
1. TDx-анализатор или FLx-анализатор фирмы "ABBOTT".
2. Набор реагентов.
3. Набор калибраторов на моче или на буфере "искусственная моча" (SU), или на сыворотке крови.
4. Буфер для анализа.
5. Карусель для стандартов.
6. Карусель для образцов.
7. Катридж для образцов.
8. Кювета для измерения.
9. Пипетка - дозатор автоматическая на 10-100 мкл или 50-200 мкл.
10. Наконечники сменные к пипетке - дозатору на 200 мкл.
11. Холодильник для хранения наборов - реагентов и образцов.
Состав буфера для анализа, PH 7,4:
0,1 М натрий - фосфатный буфер с добавлением 0,1% натрия азида.
Состав буфера "искусственная моча", PH 7,0:
мочевина 22,0 г, натрия хлорид 8,25 г, калия хлорид 5,2 г, натрия фосфат двузамещенный 1,1 г, натрия фосфат однозамещенный 1,4 г, натрия азид 1,0 г, креатинин 1,5 г, тартразин 0,01 г, вода дист. до 1 л.
1. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ
1.1. Отбор и хранение образцов
Образцы мочи и сыворотки крови собирают и хранят в стеклянной или пластиковой посуде при температуре +2 -4 град. С не более 48 ч или при необходимости длительного хранения замораживают при -20 град. С. Повторное замораживание и оттаивание нежелательны. Размороженные образцы тщательно перемешивают, дают отстояться осадку, при необходимости центрифугируют. Для ПФИА достаточное количество образца мочи для исследования на разные группы веществ - 1 мл.
1.2. Характеристика набора
Набор реагентов предназначен для применения только in vitro. Набор рассчитан на проведение 100 определений образцов биожидкостей. Продолжительность анализа 15-20 мин. Набор состоит из 4-х виал с реагентами, помещенных в пластмассовую коробку, и полностью готов к использованию. На внутреннюю часть коробки нанесен штрих - код, соответствующий определенному анализу.
Реагенты:
W - промывочный реактив;
S - антисыворотка в разведении, с консервантом и протеиновым стабилизатором;
T - трейсер в разведении, с консервантом и протеиновым стабилизатором;
P - подготовительный реактив.
Условия хранения и применения набора:
- набор хранится 1 год при температуре +2 -4 град. С;
- недопустимо замораживание набора;

- после использования набора крышки виал с реагентами должны быть плотно закрыты;
- не держать реактивы на свету и при комнатной температуре без надобности во избежание инактивации;
- нежелательно смешивать реактивы из разных серий;
- для нового набора обязательна его калибровка.

1.3. Подготовка прибора

После включения прибора и ввода даты с временем, прибор термостатируется в течение 5 мин., после чего появляется сообщение "Ready".

При использовании нового набора реагентов, требующего изменений параметров анализа, необходимо ввести новый активационный код, который указан в прилагаемом к набору вкладыше.

Для этого следует выполнить определенные действия:
- нажать SYSTM 5.1 RUN;
- ввести порядковый номер анализа, STORE;
- ввести 14-значный активационный код, STORE;
- при необходимости ввести новые параметры анализа, приведенные во вкладыше.

После проведенной активации прибор готов к работе с данным набором реагентов.

Параметры анализа
(на примере анализа опиатов в моче)

62	OPIATES U		
62.1	SPL REP	1	Число повторов образцов
62.2	SPL VOL	10.0	Конечный объем образца в кювете
62.3	BKG FAC	3.00	Коэффициент
62.4	THRSHLD	200	Величина Cut-off (ответ да/нет)
62.5	CAL VOL	10.0	Конечный объем калибратора в кювете
62.6	CAL REP	2	Число повторов калибратора
62.7	CONC A	0.00	Концентрация калибратора A
62.8	CONC B	125	Концентрация калибратора B
62.9	CONC C	250	Концентрация калибратора C
62.10	CONC D	500	Концентрация калибратора D
62.11	CONC E	1000	Концентрация калибратора E
62.12	CONC F	2000	Концентрация калибратора F
62.13	UNITS	1	Единицы измерения концентрации
62.14	CRV FIT	2	Вид обработки калибровочной кривой
62.15	MX DEV	5.0	Максимальный диапазон ед. мР повторов при калибровке
62.16	MN POLA	170.0	Минимальное значение ед. мР для станд. A при калибровке
62.17	MN SPAN	40.0	Минимальное значение ед. мР станд. A-F при калибровке

|-----+---------+----------+-----------------------------------|
|62.18|MODE | 26 |Программа для пипетирования |
|-----+---------+----------+-----------------------------------|
|62.19|GAIN | 20 <*> |Фактор усиления фотоэлектронного |
| | | |умножителя |
|-----+---------+----------+-----------------------------------|
|62.20|MX BKG | + |Максимально допустимая интенсивность |
| | | |фона образца |
|-----+---------+----------+-----------------------------------|
|62.21|MN TR | X <*> |Минимально допустимая интенсивность |
| | | |трассера |
|-----+---------+----------+-----------------------------------|
|62.22|C DATE |10/30/96 |Дата последней калибровки |
| | |<*> | |
|-----+---------+----------+-----------------------------------|
|62.23|C TIME |14:59:49 |Время последней калибровки |
| | |<*> | |

<*> Параметры 62.16, 62.19, 62.21, 62.22, 62.23 не вводятся.

1.4. Работа прибора

В ходе проведения анализа TDx-, FLx-анализатор автоматически выполняет следующие операции:

1) отбор заданного объема образца мочи или калибратора и его разбавление буфером в лунке катриджа;
2) отбор 250 мкл буфера и слив в кювету;
3) отбор первой половины разбавленного образца из лунки и слив его в кювету вместе с 750 мкл буфера;
4) измерение фоновой интенсивности флуоресценции;
5) отбор 25 мкл раствора трассера из флакона и слив его вместе с 250 мкл буфера в кювету;
6) отбор 25 мкл раствора антисыворотки из флакона и слив его вместе со второй половиной разбавленного образца и 750 мкл буфера в кювету;
7) измерение конечной интенсивности флуоресценции поляризованного света;
8) распечатка значений ед. мР и найденной концентрации вещества (по калибровочному графику, хранившемуся в памяти прибора).

Данные TDx-, FLx-анализаторов

1. Разброс измерений < 1,5%.
2. Изменение стабильности интенсивности в течение анализа < 0,1%.
3. Стандартное отклонение 3 ед. мР.
4. Диапазон интенсивности от 5x10 до 1x10 молярных эквивалентов флуоресцеина.
5. Флуоресцентная оптическая система:
длина волны возбуждения - 485 нм,
ширина волны возбуждения - 8 нм,
длина волны эмиссии - 525-550 нм.
6. Детектор - фотоумножительная трубка.
7. Источник света - вольфрам - галогеновая лампа, 8 V, 50 вт или 9 V, 70 вт.
8. Объем образца для анализа - от 50 до 500 мкл.
9. Загрузка карусели - от 1 до 20 образцов.
10. Время анализа образца - от 10 до 22 мин. (зависит от загрузки и программы).
11. Воспроизводимость системы пипетирования:
шприца для образца, от 10 до 100 мкл - +/- 0,5%;
шприца для разбавителя, от 100 до 1000 мкл - +/- 0,5%;
12. Система контроля:
температуры жидкости - 35 +/- 0,5 град. С,

температуры детектора - 40,2 +/- 0,5 град. С.

2. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

2.1. Калибровка

Для калибровки набора реагента используют набор калибраторов, состоящий из 6 виал с различными концентрациями вещества в моче (или буфере "искусственная моча") или в сыворотке крови в зависимости от анализируемых биожидкостей. Калибровку рекомендуется проводить в дубле. В карусель для калибровки помещаются 12 измерительных кювет и 12 катриджей. В катриджи в лунку для образца автоматической пипеткой - дозатором вносят не менее 50 мкл (обычно 50-200 мкл) каждого из 6 калибраторов: N 1-2 - первый калибратор, N 3-4 - второй калибратор, и т.д. Карусель и набор реагентов с открытыми виалами помещаются в прибор TDx-, FLx-анализатор. Нажимается клавиша "RUN". Прибор автоматически проводит отбор образца и реагентов и выдает распечатку с указанием полученных значений в концентрациях и ед. измерений (единицах миллиполяризации - мР). Время выполнения - около 15 мин.

Калибровка считается успешно проведенной, если ошибка при проведении анализа составляет < 1 S.D.

Перекалибровку набора реагентов рекомендуется проводить один раз в две недели или по мере необходимости, но каждый раз при работе с новым набором.

2.2. Анализ образцов мочи

Анализ образцов мочи рекомендуется проводить в дубле. В карусель для анализа помещается необходимое количество измерительных кювет и катриджей (максимальное количество измерений - 20). В катриджи в лунку для образца автоматической пипеткой - дозатором вносятся 60-200 мкл образца мочи. Карусель и набор реагентов с открытыми виалами помещается в прибор TDx-, FLx-анализатор. Нажимается клавиша "RUN". Время выполнения - 12-18 мин. После анализа всех образцов прибор выдает распечатку с указанием концентрации обнаруженного вещества, единиц измерений и фоновой интенсивности флуоресценции образца. Концентрация вещества указывается только в диапазоне концентраций калибраторов.

При анализе образцов следует учесть:

1) при концентрации вещества в моче больше пороговой проставляется знак ">=T". Результат считается положительным;

2) при концентрации вещества в моче больше значения наибольшего калибратора проставляется знак "HI". Результат считается положительным;

3) если полученное значение меньше наименьшего калибратора (0 нг, мкг/мл), проставляется знак "Low". Результат считается отрицательным.

Следует еще раз обратить внимание на то, что при получении положительного результата необходимо дальнейшее его подтверждение другими сопоставимыми методами анализа.

2.3. Расчеты и графические построения

Поляризационные флуориметры TDx-, FLx-анализаторы автоматически определяют концентрацию анализируемых веществ, используя калибровочные кривые. Для проверки правильности выполнения процедуры можно построить калибровочный график в координатах; ось абсцисс - концентрация анализируемого вещества (нг/мл, мкг/мл), выраженная в логарифмической зависимости, ось ординат - поляризация флуоресценции, выраженная в единицах миллиполяризации (мР).

Типовой калибровочный график на примере анализа опиатов приведен на рисунке.

Рис. Калибровочный график морфина. <*>

<*> Не приводится.

Если пробы были предварительно разбавлены, полученные значения концентрации следует умножить на коэффициент разведения.

2.4. Контроль качества

Контроль качества набора и выполнения анализа проводится ежедневно, перед выполнением анализа, согласно общей процедуре (см. раздел 1.2.), но с использованием вместо образцов мочи 1-3-х калибраторов. Эта процедура используется для проверки точности и достоверности анализа.

Если система функционирует нормально, то отклонения в концентрациях калибраторов не должны превышать 10%.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРОВ

3.1. Специфичность

Благодаря использованию антисывороток и трейсеров, специфичных к определяемому веществу (или веществам), достигается высокая специфичность анализа. Данные по специфичности для каждого набора реагента приводятся в сопроводительных документах к наборам.

3.2. Чувствительность

Минимально определяемая концентрация калибратора с соответствующим набором реагентов определялась по методу Родбарда, которая с 95% вероятностью отличается от 0-калибратора.

3.3. Пороговая концентрация (CUT-OFF)

Пороговая концентрация или достоверно определяемая концентрация вещества при скрининговом анализе устанавливалась индивидуально для каждого вида набора с учетом специфичности антисывороток и трейсера.

3.4. Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определения калибраторов с наборами реагентов в образцах мочи с низким, средним и высоким их содержанием не превышает 8%.

3.5. Тест на открытие

Процент открытия анализируемых веществ, добавленных в образцы с известной концентрацией, составляет 93-107%.

3.6. Тест на линейность

Отклонение от расчетной величины при разбавлении пробы, содержащей известное количество анализируемого вещества, составляет +/- 8%.