

12. *Солдатов Ю.П., Стогов М.В., Овчинников Е.Н., Губин А.В., Городнова Н.В.* Аппарат внешней фиксации конструкции Г.А. Илизарова. Оценка клинической эффективности и безопасности (обзор литературы) // *Гений ортопедии*. 2019. Т. 25. № 4. С. 588-599.
13. *Haseeb M., Butt M.F., Altaf T., Muzaffar K., Gupta A., Jallu A.* Indications of implant removal: A study of 83 cases // *Int. J. Health Sci. (Qassim)*. 2017. Vol. 11. № 1. PP. 1-7.
14. *Peña-Martínez V., Lara-Arias J., Vilchez-Cavazos F., Álvarez-Lozano E., Montes de Oca-Luna R., Mendoza-Lemus Ó.* Interosseous electrostimulation in a model of lengthening with external fixation // *Cir. Cir.* 2017. Vol. 85. № 2. PP. 127-134.

Евгений Николаевич Овчинников,
зам. директора по научной работе,
Наталья Викторовна Годовых,
мл. научный сотрудник,
Ольга Владимировна Дюрягина,
канд. ветеринарн. наук,
зав. экспериментальной лабораторией,

Максим Валерьевич Стогов,
д-р биолог. наук, доцент,
ведущий научный сотрудник,
лаборатория биохимии,
ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр травматологии
и ортопедии им. акад. Г.А. Илизарова»
Минздрава России,
Дмитрий Николаевич Овчинников,
канд. техн. наук, доцент,
кафедра «Технические системы и сервис
в агробизнесе»,
Николай Васильевич Овчинников,
доцент,
кафедра «Электрификация и автоматизация
сельского хозяйства»,
ФГБОУ ВО «Курганская государственная
сельскохозяйственная академия
им. Т.С. Мальцева»,
г. Курган,
e-mail: stogo_off@list.ru

А.А. Аристов, Ю.А. Розенбаум, Г.С. Евтушенко

Разработка автоматизированного метода оценки процесса агглютинации эритроцитов для определения группы крови человека

Аннотация

Представлен новый метод, позволяющий проводить автоматизированную оценку наличия или отсутствия процесса специфической агглютинации эритроцитов при добавлении к исследуемому образцу цельной крови моноклональных антител с целью определения его групповой принадлежности. Исследование проводится путем фотометрии образцов крови с добавленным в нее реактивом-цоликлоном, сформированных в виде лежащих капель. При этом на капельный образец оказывается механическое вибрационное воздействие, которое способствует лучшей агглютинации клеток и перераспределению их по объему образца. Экспериментально показано достоверное различие в величине фотометрических показателей образцов, в которых присутствует агглютинация, и проб, где ее нет. Данная методика может стать базой для создания автоматизированного портативного устройства для типирования крови.

Введение

Группа крови характеризуется набором антигенов, расположенных на поверхности эритроцитов, которые определяют их специфичность [1]. Существует огромное количество таких антигенов, но наиболее значимыми при переливании крови считаются антигены резус-фактора и системы АВО [2], [3]. Перед любым хирургическим вмешательством, трансплантацией органов, переливанием донорской крови реципиенту необходимо определить группу крови по классификации АВО и резус-фактор [4]-[6]. При переливании несовместимой крови в организме реципиента происходит процесс агглютинации эритроцитов. В результате этого процесса клетки теряют свою функциональную способность, что может привести к летальному исходу. Поэтому неправильный результат анализа должен быть исключен.

Основным, широко распространенным в клинической практике методом определения группы крови человека является метод типирования в прямой реакции гемагглютинации с использованием моноклональных антител [7]. В российской лабораторной практике для типирования крови широко используют моноклональные антитела отечественного производства компании «ГЕМАТОЛОГ» – цоликлоны. Цоликлоны представляют собой солевые растворы моноклональных антител

для обнаружения антигенов эритроцитов человека. Каждый реагент строго специфичен соответствующему антигену. Агглютинация эритроцитов с использованием моноклональных антител – давно рекомендованный метод для определения группы крови, но поскольку оценка результатов теста – наличие или отсутствие агглютинации в образцах – обычно проводится визуально медицинским персоналом, возможны ошибки. Так, в случае слабой агглютинации агрегаты клеток могут быть практически неразличимы визуально и картина агглютинации может проявиться лишь спустя длительное время. Соответственно, такие образцы могут быть приняты за разцы, в которых отсутствует агглютинация. В работе [8] показано, что частота ошибок первичного определения группы крови в лечебных отделениях составляет порядка 0,41...1,16 %. Таким образом, субъективный фактор может привести к неверному результату анализа и фатальному исходу хирургического вмешательства. Также недостатками метода являются большой расход реагентов и продолжительность исследования.

Современные автоматические анализаторы для типирования крови являются стационарными, весьма габаритными устройствами, предназначенными для использования в крупных медицинских центрах. Они основаны на использовании специальных гель-карт. Метод гель-карт включает в себя пробо-

подготовку крови (получение эритроцитарной массы) и является достаточно дорогостоящим [9]. Исходя из вышесказанного, актуальной остается задача разработки устройства, использующего малые объемы крови и реактивов для анализа, требующего минимальной пробоподготовки и позволяющего за короткий промежуток времени выдать верный результат [10].

Материалы и методы

В современных исследованиях, направленных на выявление агглютинации эритроцитов для определения группы крови, применяют различные подходы. Регистрация агглютинации методом цифровой фотографии используется в автоматизированной системе микропланшетов [11]. Проводят исследование типирования крови при помощи микрофлюидного чипа [12], [13]. В качестве чувствительных элементов процесса агглютинации используют фотонно-кристаллические волокна [14]. Известен акустооптический метод обнаружения агглютинации с использованием анализа цифровых изображений [15], [16]. Большинство вышеперечисленных методов определения процесса агглютинации требуют проведения пробоподготовки цельной крови либо визуализацию результата исследования при помощи видеосистем, что усложняет процесс исследования или требует дополнительных вычислительных ресурсов для обработки видеосигналов.

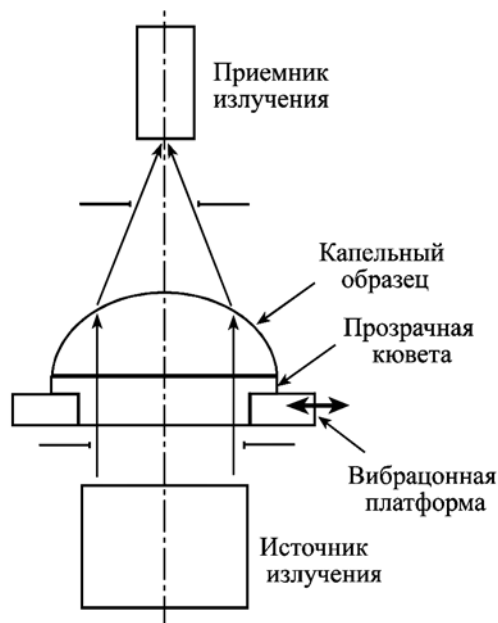


Рис. 1. Схема фотометрии капельных проб

В настоящей статье представлен метод контроля наличия или отсутствия процесса агглютинации в пробах крови, основанный на фотометрии капельных образцов [17]-[19]. Принцип обнаружения агглютинации эритроцитов основан на фотометрическом методе регистрации изменения интенсивности светового потока, прошедшего через образец крови в процессе образования эритроцитарных агрегатов. Образование агрегатов происходит в случае специфической гемагглютинации эритроцитов крови при добавлении к ней соответствующего моноклонального антитела. Для усиления процесса образования агглютинатов в капельном образце и их отделения от прозрачной части реакционной смеси на каплю оказывается вибрационное воздействие. Вибрация капель осуществляется путем возвратно-поступательного перемещения в горизонтальной плоскости вибронной платформы, на которой размещается кювета с образцами крови. В экспериментальных исследованиях мы использовали частоту вибраций 15...30 Гц и амплитуду колебаний платформы 0,5...1 мм. С использованием разработанного макета устройства для определения группы крови проведена серия опытов и получены достоверные различия в изменении оптических свойств между образцами с положительной и отрицательной агглютинацией. Исследова-

ния проводились с использованием человеческой цельной крови доноров-добровольцев и моноклональных антител производства компании «ГЕМАТОЛОГ» (Россия). Было исследовано около 100 образцов крови.

При исследовании пробу анализируемой крови, с добавленным в нее реактивом располагали на специальной прозрачной кювете в виде лежащей капли. Кювету с пробами помещали в измерительную камеру устройства. Капельный образец содержал цельную кровь и реактив-целикцион в соотношении 1 : 3 (подобрано экспериментальным путем). Гематокрит образцов крови, использованных в исследованиях, был от 20 до 55 %. Объем исследуемого образца составлял порядка 16...20 мкл (4...5 мкл крови и 12...15 мкл реактива). Световой поток от источника излучения, расположенного под каплей, проходил через образец и попадал на фотоприемник, расположенный в области оптического фокуса капли (рис. 1).

В исследованиях в качестве источника излучения использовался светодиод ближнего ИК-диапазона. В течение заданного программным путем времени регистрировалось изменение величины интенсивности светового потока, прошедшего через каплю крови. Сигнал с фотоприемника усиливался и передавался через блок АЦП (USB 6009, «National Instrument») на компьютер. По полученным данным, на дисплей компьютера (при помощи программы, написанной в среде LabVIEW) автоматически выводились графики зависимости напряжения от времени, которые отражали изменения величины светового потока, прошедшего через каплю. А интенсивность светового потока, попадающего на фотоприемник, как отмечено выше, определяется оптическими свойствами просвечиваемого образца и меняется с течением времени в зависимости от процессов, протекающих в капельной пробе. В данном случае – от наличия или отсутствия агглютинации эритроцитов в пробе. Контроль наличия (или отсутствия) агглютинации в образцах после исследования проводился визуально. В качестве контрольного образца с отрицательной агглютинацией бралась проба исследуемой крови, разведенная физиологическим раствором в том же соотношении, что и кровь в опытных образцах.

Результаты экспериментальных исследований и их обсуждение

В ходе исследований установлено, что при отсутствии агглютинации в пробе светопропускание образца (рис. 2а, кривая 1) соизмеримо с величиной светопропускания контрольного исследования (рис. 2а, кривая 2). При наличии агглютинации эритроцитов в течение 30...60 с происходит значительное просветление капли (рис. 2а, кривая 3). Величина выходного напряжения, регистрируемого с фотопреобразователя, минимум в 2...3 раза превышает величину напряжения с канала контрольного образца. Такая динамика поведения фотометрических кривых была свойственна для всех исследуемых проб, где происходила агглютинация. Наблюдались лишь отличия в скорости нарастания сигнала (рис. 2б), что можно объяснить разной скоростью образования эритроцитарных агглютинатов в образцах.

При наличии в исследуемом образце агглютинатов (положительный тест) происходит уменьшение рассеивающих свойств, среда становится более прозрачной и светопропускание образцов увеличивается. Однако данный фактор не является определяющим в этом методе исследования. За счет использования кюветы специальной формы и вибрации наблюдается просветление исследуемого образца именно в центральной части из-за объединения мелких агглютинатов в крупные агломераты и перераспределения их по периферии в результате течений, возникающих в образце при колебании капли (рис. 3).

По мере очистки центральной области капли от агглютинатов образец, в результате того, что он имеет форму линзы, начинает фокусировать световой поток, прошедший через него, на фотоприемник, расположенный в области фокуса капли. Это приводит к значительному увеличению величины светового потока, попадающего на приемник.

При использовании метода фотометрии в плоской горизонтальной кювете, в которой происходит агглютинация эритроцитов, также наблюдается просветление среды, но присутствуют значительные флуктуации светового потока из-за не-

равномерного распределения и перемещения агрегатов в зондируемой оптической области (рис. 4). Это затрудняет анализ кривых и возможность постановки по ним заключения об агглютинации в образце.

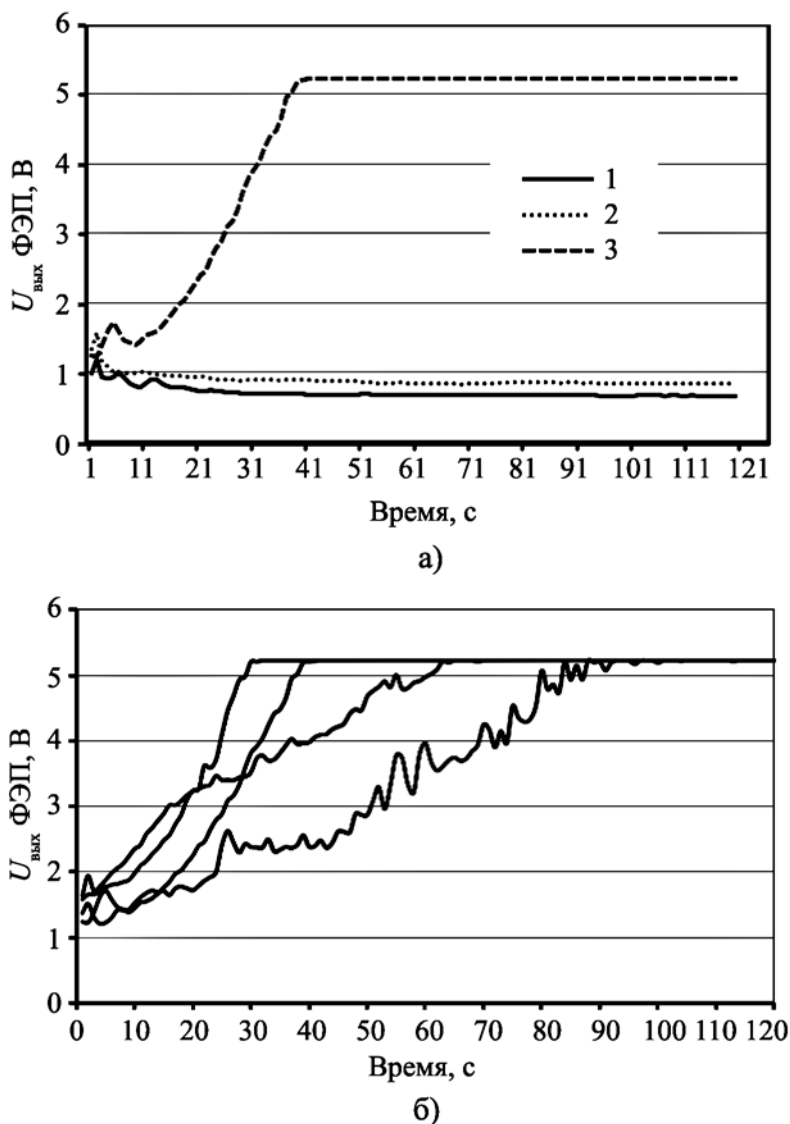


Рис. 2. Графики изменения выходного сигнала с фотоэлектронного преобразователя (ФЭП) устройства (отражают изменение светопропускания капельного образца). Максимальный уровень сигнала, подаваемого на АЦП, ограничен 5 В, поэтому уровень сигнала на графиках не превышает 5 В: а) при отсутствии агглютинации (кривая 1), для контрольной пробы (кривая 2), при наличии агглютинации (кривая 3); б) сравнительные графики для нескольких образцов в случае наличия в них агглютинации эритроцитов

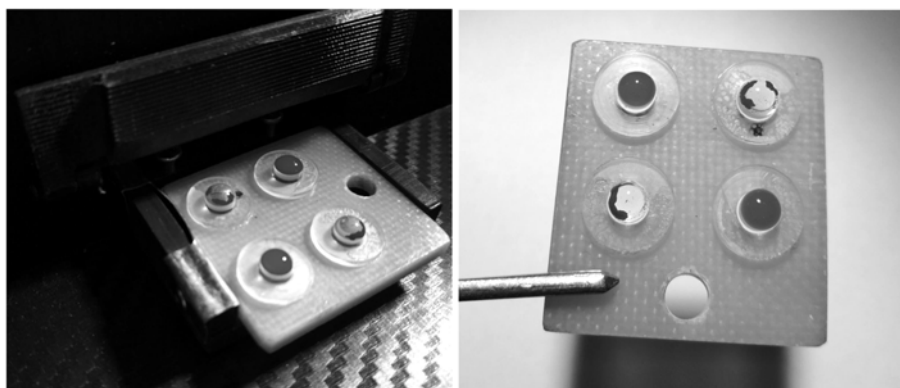


Рис. 3. Фото кюветы с капельными образцами после вибрации в установке в течение 1 мин. При положительной агглютинации агглютинаты расположены по периметру основания капли

В случае использования капли за счет фокусировки на фотоприемник приходит интегрированный световой поток; если имеются локальные флуктуации светового потока в разных частях капли, то они влияют на общий уровень сигнала, регистрируемого фотоприемником, незначительно.

Наличие процесса агглютинации дает возрастание сигнала, регистрируемого с фотоприемного устройства, в 2...3 раза по сравнению с первоначальным уровнем сигнала в момент нанесения пробы либо относительно величины сигнала контрольного канала. При отсутствии в исследуемом образце агглютинатов (отрицательная реакция) при вибрации капле происходит простое размешивание образца. Среда исследуемого образца становится мутной после перемешивания цельной крови с реактивом, и сигнал с выхода фотозлектронного преобразователя уменьшается. Для проб с отрицательной агглютинацией (рис. 2а, кривая 1) после перемешивания светопропускание образцов было соизмеримо с величиной светопропускания контрольной пробы (рис. 2а, кривая 2).

Таким образом, исходя из полученных результатов по анализу экспериментальных фотометрических кривых, критерием наличия агглютинации в пробе можно принять превышение величины сигнала с канала образца в 2 раза относительно контрольного канала.

Выводы

Данные исследования по типированию крови методом фотометрии капле являются пилотными и будут продолжены. В результате проведенных экспериментальных исследований доказан факт, что используемый нами метод фотометрии капельных образцов при дополнительном вибрационном воздействии на пробу позволяет определить наличие или отсутствие процесса агглютинации в образцах цельной крови при добавлении к ней моноклональных антител. Данная инструментальная методика выявления агглютинации может быть в дальнейшем использована для создания устройства для автоматического определения группы крови.

Существенными отличиями предлагаемого нами метода являются: использование малых объемов биологического материала и моноклональных антител, возможность автоматической интерпретации наличия или отсутствия агглютинации, отсутствие этапа пробоподготовки, отсутствие субъективного фактора, малое время анализа. При хорошей агглютинации для исследования (установления факта агглютинации) достаточно 30 с, при слабой агглютинации – 2...3 мин. Данный метод требует для проведения анализа малого объема цельной крови (порядка 20 мкл), что очень важно для пациентов детского возраста и людей, страдающих анемией или потерявших много крови в чрезвычайных ситуациях.

Чтобы добиться высокой чувствительности и специфичнос-

ти предлагаемой методики, с целью обнаружения слабой агглютинации в исследуемых образцах с высокой достоверностью, следует доработать методику проведения эксперимента, определить необходимые параметры оптической измерительной системы, выработать соответствующую методику и алгоритм обработки получаемых в ходе анализа данных. Эти задачи будут решаться в наших дальнейших исследованиях.

Список литературы:

1. *Misevic G.* ABO blood group system // *Asia-Pacific Journal of Blood Types and Genes.* 2018. Vol. 2. № 2. PP. 71-84.
2. *Watkins W.M.* The ABO blood group system: Historical background // *Transfusion Medicine.* 2001. Vol. 11. № 4. PP. 243-265.
3. *Dean L.* Blood groups and red cell antigens. – Bethesda, Md, 2005. USA: NCBI / https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/pdf/Bookshelf_NBK2261.pdf (дата обращения: 15.09.2020).
4. *Nichols J.H. et al.* Reducing medical errors through barcoding at the point of care // *Clinical Leadership & Management Review: The Journal of CLMA.* 2004. Vol. 18. № 6. PP. 328-334.
5. *Storry J.R. et al.* GUTI: A new antigen in the Cromer blood group system // *Transfusion.* 2003. Vol. 43. № 3. PP. 340-344.
6. *Reid M.E., Mohandas N.* Red blood cell blood group antigens: Structure and function // *Seminars in Hematology.* 2004. Vol. 41. PP. 93-117.
7. *Voak D.* Monoclonal antibodies as blood grouping reagents // *Bailliere's Clinical Haematology.* 1990. Vol. 3. № 2. PP. 219-242.
8. *Жибурт Е.Б., Караваев А.В., Глазов Н.Н., Шестаков Е.А.* Особенности национального определения группы крови // *Вестник Росздравнадзора.* 2012. № 2. С. 66-68.
9. *Ayan E., Yildirim E.K.* Real time blood type determination by gel test method on an embedded system // *International Journal of Applied Mathematics, Electronics and Computers.* 2016. № 4 (Special Issue). PP. 412-415.
10. *Malomgré W., Neumeister B.* Recent and future trends in blood group typing // *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2009. Vol. 393. № 5. PP. 1443-1451.
11. *Makulska S., Jakiela S., Garstecki P.A.* Micro-rheological method for determination of blood type // *Lab on a Chip.* 2013. Vol. 13. № 14. PP. 2796-2801.
12. *Kim D.S. et al.* Disposable integrated microfluidic biochip for blood typing by plastic microinjection moulding // *Lab on a Chip.* 2006. Vol. 6. № 6. PP. 794-802.

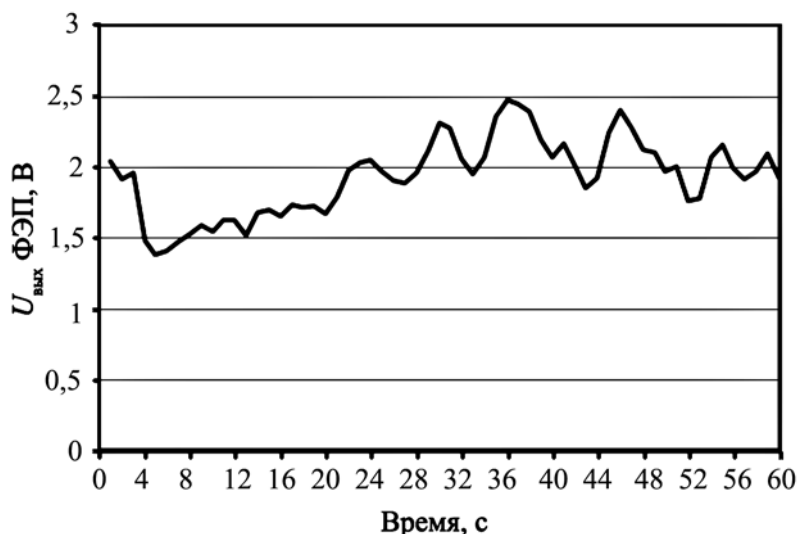


Рис. 4. График изменения выходного сигнала с фотозлектронного преобразователя устройства в процессе специфической агглютинации эритроцитов в плоскопараллельной горизонтальной кювете при ее вертикальном просвечивании

13. Huet M., Cubizolles M., Buhot A. Real time observation and automated measurement of red blood cells agglutination inside a passive microfluidic biochip containing embedded reagents // Biosensors and Bioelectronics. 2017. Vol. 93. PP. 110-117.
14. Malinin A. V. et al. Determination of blood types using a chirped photonic crystal fiber // Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics VIII. 2011. Vol. 7898. P. 78981A.
15. Дубровский В.А., Медведева М.Ф. Акустооптический метод определения группы крови человека: сравнение применения анти-А и анти-В моноклональных антител и стандартных гемагглютинирующих сывороток // Саратовский научно-медицинский журнал. 2017. Т. 13. № 1. С. 022-028.
16. Doubrovski V.A., Medvedeva M.F., Torbin S.O. An acousto-optical method for registration of erythrocytes' agglutination reaction – Sera color influence on the resolving power // Optics and Spectroscopy. 2016. Vol. 120. № 1. PP. 58-64.
17. Аристов А.А., Носова Е.В., Солдатов А.Н. Применение метода фотометрии лежащих капель для задач клинической лабораторной диагностики // Медицинская техника. 2016. № 5. С. 19-22.
18. Aristov A.A., Nosova E.V. Method of evaluation of process of red blood cell sedimentation based on photometry of droplet samples // Journal of Medical and Biological Engineering and Computing. 2017. Vol. 55. PP. 621-630.
19. Aristov A.A., Evtushenko G.S., Ermolovich D.G. Micromethod of an estimate of erythrocyte sedimentation rate / Proc. SPIE. 2008. Vol. 7006. 10 p.

Александр Александрович Аристов,
канд. техн. наук, доцент,
Юлия Андреевна Розенбаум,
аспирант,
отделение электронной инженерии,
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет»,
г. Томск,
Геннадий Сергеевич Евтушенко,
д-р техн. наук, гл. научный сотрудник,
Государственный центр экспертизы
в сфере науки и инноваций,
ФГБНУ НИИ «Республиканский
исследовательский научно-консультативный
центр экспертизы Министерства науки
и высшего образования РФ,
г. Москва,
профессор,
отделение электронной инженерии,
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет»,
г. Томск,
e-mail: aristov@tpu.ru

В.Е. Курочкин, Д.А. Белов, Ю.В. Белов, А.Н. Зубик

Методика определения характерных параметров при плавлении ДНК в анализаторах нуклеиновых кислот

Аннотация

Современные методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) и плавления молекулы ДНК реализуются на анализаторах нуклеиновых кислот. Предложено использовать особенности регистрации сигналов плавления анализаторами серии АНК с целью уменьшения погрешности определения основного характерного параметра анализа – температуры плавления ДНК T_m . Предложена методика определения ширины интервала плавления ΔT для использования в качестве дополнительного критерия специфичности полученного продукта ПЦР. Выполнена оценка погрешностей измерений: значения СКО величины T_m – не более 0,11 °С; величины ΔT – не более 0,06 °С.

Введение

Анализы на основе метода плавления молекул ДНК, реализуемые на анализаторах нуклеиновых кислот после проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), широко используются в том числе для детектирования модифицированных нуклеотидов, оценки специфичности проведения ПЦР и дискриминации аллелей с целью выявления мутации ДНК. В Институте аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН, г. С.-Петербург) серийно выпускаются анализаторы нуклеиновых кислот серии АНК, обеспечивающие:

- качественное и количественное определение молекул ДНК методом ПЦР-РВ в 32, 48 или 64 пробирках одновременно;
- детектирование всех основных красителей и анализ до 5 компонентов в каждой пробирке одновременно;
- реализацию анализа методом плавления ДНК.

Анализаторы серии АНК успешно применяются при проведении клинических анализов, для санитарного и экологического контроля, а также в судебно-медицинской экспертизе [1]. Анализаторы допущены к обращению на территории РФ в качестве изделий медицинской техники.

В результате анализов методом плавления молекул ДНК получаются графики плавления продуктов амплификации, представляющие собой зависимость измеренной величины флуоресцентного отклика от температуры образца.

Существуют два режима получения графиков плавления ДНК [2]:

- 1) непрерывный режим, при котором значения флуоресцентного отклика регистрируются с минимально возможным шагом при постоянном изменении температуры образцов с постоянной скоростью;
- 2) пошаговый режим, при котором значения флуоресцентного отклика регистрируются в течение каждого температурного шага после достижения заданной температуры.

Непрерывный режим обеспечивает значительную экономию времени, так как для обеспечения высокого разрешения, позволяющего различать однонуклеотидные замены фрагментов ДНК, и уменьшения погрешности измерения значения T_m шаг изменения температуры не должен превышать 0,1 °С. При этом увеличивается разброс температур между пробирками и наблюдается различие температуры пробирок и датчика температуры, что пагубно сказывается на качестве результатов анализа. Наиболее сильно этот недостаток выражен при ре-