DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2021.10.4.009>
УДК 616-008.848.4-072.5-71

Ситник Г.В., Камышников В.С., Лебедева П.А., Степанова Ю.И., Алехнович Л.И., Юрага Т.М.
Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Sitnik H., Kamyshnikov V., Lebedeva P., Stepanova Yu., Alekhnovich L., Yuraga T.
Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Лабораторное исследование слезной жидкости на основе использования стандартизированной технологии ее забора и пробоподготовки: результаты валидации способа взятия биологической жидкости

Laboratory Study of Tear Fluid Based on the Use of a Standardized Technology for Its Collection and Sample Preparation: Results of Validation of the Method for Taking Biological Fluid

Резюме

Представленный способ забора слезной жидкости для лабораторного исследования с помощью полосок Ширмера по сравнению с другими методами получения слезы отличается безопасностью, доступностью и осуществим в том числе у пациентов с недостаточностью слезопродукции. Цель валидации представленного способа забора слезной жидкости – документированное подтверждение правильности выбора способа забора биологической жидкости для конкретного применения в реальных условиях. В результате проведения валидации получены неопровержимые объективные свидетельства того, что требования для использования конкретного способа забора слезной жидкости с целью лабораторного исследования были выполнены. Полученные результаты испытаний удовлетворяли критериям правильности, сходимости и воспроизводимости.

Ключевые слова: слезная жидкость, способ забора, полоски Ширмера, валидация, правильность, сходимость, воспроизводимость.

Abstract

The presented method of collecting tear fluid for laboratory testing using Schirmer strips, compared with other methods of obtaining tears, is characterized by minimal trauma, safety and is feasible, including in patients with a pronounced deficiency of the aqueous part of the tear. This method is characterized by accessibility, is easily feasible, and expands the possibilities of conducting studies of tear fluid in patients with insufficient tear production. The purpose of the validation of the presented method of lacrimal fluid intake is a documented confirmation of the correctness of the choice of the method of biological fluid intake for a specific application in real conditions. As a result of the validation, irrefutable objective evidence was obtained that the requirements for using

a specific method of collecting tear fluid for the purpose of laboratory testing were met. The test results obtained met the criteria of correctness, convergence and reproducibility.

Keywords: lacrimal fluid, sampling method, Schirmer strips, validation, correctness, convergence, reproducibility.

■ ВВЕДЕНИЕ

Слеза представляет собой сложную биологическую жидкость, которая непрерывно увлажняет глазную поверхность и осуществляет ее механическую и антимикробную защиту, а также обеспечивает кислородом и питательными веществами аваскулярную ткань роговицы [1]. В нормальных условиях скорость продукции слезной жидкости составляет 0,5–2,2 мкл/мин со скоростью оборота примерно 16% в минуту [2]. Объем слезы, присутствующий на глазной поверхности, составляет 7–10 мкл. Несмотря на столь небольшой объем, роль слезной жидкости в обеспечении нормального функционирования глаза весьма значительна. Слеза является чрезвычайно сложной биологической жидкостью, состоящей из белков, электролитов, липидов, углеводов, гормонов и биологически активных молекул, таких как аминокислоты, нуклеозиды, витамины [3].

Покрывающая глазную поверхность слезная жидкость состоит из нескольких слоев: липидного, наиболее поверхностного; водной фазы, содержащей электролиты, большое количество секретируемых слезной железой пептидов и гликопротеинов; а также муцинового слоя, представленного гликопротеинами, секретируемыми клетками эпителия. Поскольку слезная пленка также является оптической преломляющей средой, ее стабильность имеет решающее значение для достижения оптимальной остроты зрения [4].

Количественно и качественно состав слезы должен находиться в довольно узких пределах, чтобы поддерживать нормальное функционирование зрительного анализатора. Химические изменения состава слезной жидкости могут быть связаны с системными нарушениями в организме и с патологией органа зрения (сосудистые и воспалительные заболевания глаза, травмы, инфекционные процессы, послеожоговые изменения, глаукома, патология роговицы) [5]. В настоящее время большое внимание уделяется изучению качественного состава слезной жидкости при диагностике заболеваний органа зрения с использованием биохимических, иммунохимических, цитологических, кристаллографических и других методов исследования.

Скрининг биомаркеров различных биологических жидкостей организма имеет потенциальные преимущества не только при изучении физиологических процессов, но и для ранней диагностики и эффективной терапии ряда заболеваний. Слезная жидкость, подверженная воздействию как внутренней, так и внешней среды обитания человеческого организма, содержит в себе большое количество молекулярной информации, необходимой для диагностики, прогнозирования и лечения заболеваний глазной поверхности [6]. Следовательно, слеза представляет собой объект исследования не только при офтальмологических,

но и при системных заболеваниях, а также при изучении фармакокинетики лекарственных средств.

Существующие методы забора слезы зачастую требуют значимых временных и трудовых затрат, а также вызывают дискомфорт у пациентов. На сегодняшний день существует необходимость в простом и надежном методе забора слезной жидкости, который позволял бы получать пробы при исходно малом объеме биоматериала, а также хранить и извлекать биохимические субстанции из полученных образцов с целью проведения их лабораторного исследования [7].

В настоящее время для получения слезной жидкости применяется несколько способов. Одним из весьма распространенных является ее прямой сбор в стеклянный капилляр, один из концов которого погружается в нижний свод конъюнктивного мешка глаза [8]. При этом, как правило, происходит дополнительная стимуляция слезоотделения рефлекторного характера вследствие касания капилляром глазной поверхности, что создает эффект разведения слезы, сказывающегося на результатах исследования ее химического состава. К тому же слезная жидкость собирается медленно, прерывисто из-за моргания и движения глаз, причиняя пациенту значимый дискомфорт, особенно выраженный при наличии эрозий эпителия глазной поверхности, воспалительной патологии, а также при болезни сухого глаза. Кроме этого, данный метод требует специальной профессиональной подготовки в силу большого риска возникновения механических травм; он не подходит пациентам с выраженным дефицитом водного компонента слезы (болезнь сухого глаза, болезнь Шегрена, хронические воспалительные офтальмологические заболевания различной этиологии).

С диагностической и научной целью применяется также способ забора слезы путем абсорбции, который осуществляется с помощью поглощающего материала, помещенного в нижний конъюнктивный свод. В качестве такового используются ацетатцеллюлозные фильтры, поливинилацетатные губки, а также фильтровальная бумага (полоски Ширмера) для применения в офтальмологической практике в целях постановки диагностического теста на слезопродукцию (теста Ширмера) [9, 10].

Основным предназначением теста Ширмера является определение объема продуцируемой слезной жидкости. Он принят в качестве «золотого стандарта» в диагностике степени выраженности слезодефицита при синдроме сухого глаза, а также при системной патологии [10]. Помимо своего прямого назначения, этот тест позволяет использовать образцы слезной жидкости для исследования биохимического состава слезы. В сравнительных исследованиях была проведена оценка характеристик пробы Ширмера с таковыми капиллярного метода получения слезной жидкости с целью ее дальнейшего использования для лабораторного исследования [11–13]. Продемонстрированы атравматичность, простота и доступность применения полосок Ширмера. Решающим критерием в пользу их использования явилась возможность провести забор биологического материала у пациентов с выраженным дефицитом слезной жидкости. Имеет значение и то, что данный способ забора не требует дополнительного специального оборудования и, как показали результаты его испытания, обеспечивает получение достоверных данных об

Рис. 1. Получение слезной жидкости с помощью полосок Ширмера: А – полоски стерильной фильтровальной бумаги размером 5×35 мм с нанесенной на них градуированной шкалой; В – полоски, которые на первом этапе исследования сгибают по нулевой линии под углом 120 градусов; С – помещение полосок за веко; D – смыкание век (закрывают глаза) на 5 минут

Fig. 1. Obtaining tear fluid with the help of Schirmer strips: A – Schirmer strips are sterile 5×35 mm filter paper with a graduated scale applied; B – the strips are bent along the zero line at an angle of 120 degrees; C – the strips are placed behind the eyelid in the middle position; D – the eyes are closed for 5 minutes

объеме слезы и содержании в ней отдельных биохимических компонентов (протеинов) [14]. В настоящее время техника проведения теста Ширмера регламентирована рекомендациями по диагностическим методам Международного общества экспертов по изучению слезной пленки и глазной поверхности (TFOS), она представлена на рис. 1 [15].

Сущность технологии исследования состоит в помещении стерильной полоски фильтровальной бумаги размером 5×35 мм в нижний конъюнктивальный свод. Пробу проводят одновременно на обоих глазах. После размещения полосок пациента просят закрыть глаза на 5 минут, затем полоски извлекают и оценивают степень их увлажнения путем измерения длины зоны, смоченной слезой.

Для расчета объема собранной слезы по количеству миллиметров смачивания полоски Ширмера организацией-производителем была разработана стандартная кривая [15, 16]. Установлена линейная зависимость между объемом слезы в микролитрах (мкл) и размером зоны смачивания в миллиметрах (мм). При этом количество миллиметров соответствует такому же количеству микролитров: 1 мм зоны, смоченной слезой, полоски Ширмера соответствует 1 мкл слезной жидкости.

Исследования по адаптации способа забора слезной жидкости с помощью полосок Ширмера для последующего ее лабораторного исследования впервые в Республике Беларусь осуществлены в ходе выполнения темы НИР «Разработать и внедрить методы лечения пациентов с кератоконусом III–IV стадий» (рег. № НИОКТР 11/2016-33, срок исполнения – 2020–2021 гг., научный руководитель и ответственный исполнитель – Г.В. Ситник).

Целью данного валидационного исследования является документированное подтверждение правильности выбора способа забора биологической жидкости для конкретного применения по назначению в реальных условиях. Требуется аргументированно с использованием объективных статистических критериев оценки показать, что предложенный способ позволяет получить определенный объем слезной жидкости, с учетом констатации факта, что 1 мм полоски Ширмера, смоченный слезой, соответствует 1 мкл слезы.

■ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Объектом валидации явился реализуемый с помощью полосок Ширмера способ забора слезной жидкости для ее лабораторного исследования.

Критериями пригодности способа забора слезной жидкости для выполнения клиничко-лабораторных исследований являются: правильность, сходимость и воспроизводимость.

При проведении валидации руководствовались соответствующей нормативной документацией: ТКП 125-2008 (02040) «Надлежащая лабораторная практика», руководством ICH «Валидация аналитических методик: текст и методология (Q2)», EURACHEM/CITAC «Валидация аналитических методик» (второе издание).

При выполнении валидационных испытаний использованы следующие средства измерений и реактивы:

- полоски Ширмера стерильные TearFlo™ Schirmer для получения слезы производства Biovision limited (Великобритания), изготовленные из сертифицированной фильтровальной бумаги (CE 2460);
- микропробирки полимерные однократного применения объемом 1,5 мл типа «Эппендорф»;
- одноканальный дозатор пипеточный переменного объема 0,5–10 мкл ВК27894 КОЛОП ЗАО «Лаб-Системс СПб» (диапазон измерений от 0,5 до 10 мкл; класс точности $\pm 10,0\%$ до $\pm 2,5\%$);
- лабораторная центрифуга для микропробирок MPW-351R производства «MPW Med. Instruments» (Польша);
- раствор хлорида натрия 0,9 г/л стерильный.

Проведение испытаний

При проведении валидационных испытаний в лаборатории соблюдались следующие условия:

- температура окружающей среды 20 ± 5 °C;
- температура приготовленных растворов 20 ± 2 °C;
- влажность воздуха 40–80% при температуре 20 ± 5 °C.

Испытания проводились в экспериментальных условиях с максимально возможной имитацией процесса получения слезной жидкости в клинической практике. Вместо слезы использовали (в качестве контроля) стерильный раствор хлорида натрия 0,9 г/л, так как физическая плотность слезной жидкости соответствует плотности физиологического раствора [17].

Ход испытаний:

1. Определенный объем стерильного физиологического раствора хлорида натрия (0,9 г/л) с помощью автоматической пипетки переносили на закругленный конец полоски Ширмера. Полоску помещали в пробирку «Эппендорф», лежащую на плоской поверхности.
2. Через 30 секунд регистрировали длину зоны смачивания полоски по нанесенной на нее шкале в миллиметрах.
3. Осуществляли серийные испытания для каждого тестируемого объема физиологического раствора – 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 и 5,0 мкл. Каждая серия состояла из 10 исследуемых образцов. Погрешность автоматической пипетки с переменным объемом от 0,5 до 10 мкл составляла $\pm 0,5\%$.

4. Проводили статистический анализ полученных результатов с расчетом следующих показателей: среднее значение, стандартное отклонение, точность измерения, коэффициент вариации, что представлено в таблице.

Как видно из представленных в таблице данных, с вероятностью 95% следует утверждать, что доверительный интервал среднего значения, стандартного отклонения и коэффициента вариации содержит установленный уровень данных параметров. Показано, что все абсолютные значения длины зоны полоски в мм, смоченной раствором хлорида натрия, находились в границах ($X_{ср} \pm 2s$), что считается пределом точности анализа. При этом показатели точности не превышали 1%, что свидетельствует о правильности проведенных измерений [18].

Коэффициент вариации для различных опытных серий составил от 1,3 до 2,9. Уровень коэффициента вариации менее 3% свидетельствует

Результаты статистического анализа данных, полученных в ходе испытаний способа забора слезной жидкости для лабораторного исследования

The results of statistical analysis of the data obtained during the tests of the method of collecting tear fluid for laboratory testing

№ п/п анализируемой полоски Ширмера	Длина зоны смачивания полоски Ширмера, мм				
	Объем раствора хлорида натрия 0,9 г/л 1 мкл	Объем раствора хлорида натрия 0,9 г/л 2 мкл	Объем раствора хлорида натрия 0,9 г/л 3 мкл	Объем раствора хлорида натрия 0,9 г/л 4 мкл	Объем раствора хлорида натрия 0,9 г/л 5 мкл
1	1	2,0	3,1	4,0	5,1
2	1	2,0	3,0	4,0	5,0
3	1	1,90	3,0	3,9	5,0
4	1,05	2,0	2,9	4,0	4,9
5	1	2,0	3,0	4,0	5,0
6	1	2,0	3,0	4,0	5,0
7	1	1,9	3,1	3,9	5,1
8	0,95	2,0	3,0	4,0	5,0
9	1	2,1	3,0	4,1	5,0
10	1,05	2,0	2,9	4,0	4,9
Минимум	0,95	1,9	2,9	3,5	4,9
Максимум	1,05	2,1	3,1	4,1	5,1
Среднее значение ($X_{ср}$)	1,0	1,99	3,0	3,99	5,0
Доверительный интервал 95%	0,98–1,025	1,95–2,03	2,95–3,05	3,95–4,03	4,95–5,05
Стандартное отклонение (σ)	0,028	0,056	0,066	0,057	0,066
Доверительный интервал 95%	0,019–0,051	0,039–0,103	0,045–0,121	0,039–0,103	0,045–0,121
Коэффициент вариации, %	2,8	2,9	2,2	1,4	1,3
Доверительный интервал 95%	1,69–3,95	1,70–4,00	1,50–2,90	0,85–1,99	0,90–1,75
Показатель точности, %	0,89	0,90	0,70	0,45	0,42

об однородности совокупности представленных данных, что обусловлено достаточной сходимостью и воспроизводимостью исследуемого способа забора слезной жидкости [19, 20]. Полученные результаты испытаний удовлетворяли критериям правильности, сходимости и воспроизводимости [21].

Преаналитический и аналитический этапы лабораторного исследования слезной жидкости

1. Получение слезной жидкости с помощью теста Ширмера, как представлено на рис. 1.
2. Внесение образца (аликвоты) слезы в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл: часть полоски Ширмера, пропитанную слезой, отрезают и помещают в пробирку «Эппендорф», содержащую 500 мкл физиологического раствора хлорида натрия 0,9 г/л, что представлено на рис. 2.
3. Транспортировка пробы слезной жидкости в лабораторию.
4. Центрифугирование доставленной пробы при 3000 оборотов в минуту в течение 10 минут на общеклинической центрифуге с целью элюирования компонентов слезной жидкости в физиологический раствор.
5. Лабораторное исследование слезной жидкости проводится либо сразу после доставки ее в лабораторию, либо в случае выполнения отсроченных исследований пробу замораживают и хранят в рефрижераторе при температуре -70°C , избегая повторного замораживания после размораживания.

Рис. 2. Внесение образца слезной жидкости в пробирку типа «Эппендорф»: А – зона полоски Ширмера, пропитанная слезой, указана стрелкой; В – часть полоски Ширмера, пропитанную слезой, отрезают и помещают в пробирку, содержащую 500 мкл физиологического раствора хлорида натрия 0,9 г/л; С – закрытая пробирка с образцом слезной жидкости

Fig. 2. Introduce a sample of tear fluid into an Eppendorf test tube: А – the zone of the Schirmer strip impregnated with a tear, indicated by an arrow; В – the part of the Schirmer strip, soaked with a tear, is cut off and placed in a test tube containing 500 μl of saline solution of sodium chloride 0.9 g/l; С – the closed tube with a tear fluid sample

6. Проведение лабораторного исследования слезной жидкости на современных биохимических, иммуноферментных или иммунохимических анализаторах в соответствии с инструкциями к тест-наборам реагентов с осуществлением внутрилабораторного контроля качества.
7. Расчет результата по формулам.

Определение концентрации аналитов в образцах слезной жидкости проводится в соответствии с установленными методами с последующим учетом коэффициента разведения слезы физиологическим раствором. С этой целью необходимо провести расчет исходного объема забранной для исследования слезы: если 1 мм пропитанной слезной жидкостью полоски соответствует 1 мкл ее объема, то фактический объем полученной слезы ($V_{\text{слезы}}$) в мкл равен длине смоченной зоны полоски в 1 мм. Конечный объем образца ($V_{\text{образца}}$) для лабораторного анализа включает объем забранной слезной жидкости и объем физиологического раствора в 500 мкл, который использовали для разведения:

$$V_{\text{образца}} = V_{\text{слезы}} + 500 \text{ мкл}$$

Коэффициент разведения ($K_{\text{разв}}$) образца слезной жидкости рассчитывают по формуле:

$$K_{\text{разв}} = \frac{V_{\text{образца}}}{V_{\text{слезы}}}$$

Пример проведения забора и лабораторного исследования слезной жидкости у пациента офтальмологического профиля

Пациентка Н., 35 лет, обратилась в офтальмологическое консультативно-диагностическое отделение УЗ «10-я ГКБ г. Минска» с жалобами на снижение зрения. Из анамнеза установлено, что у пациентки имеется кератоконус, для коррекции зрения она пользовалась контактными линзами, в последнее время не могла носить линзу на правом глазу из-за выраженного дискомфорта. С научной целью для оценки состояния роговицы и глазной поверхности в целом было необходимо определить содержание следующих биохимических параметров слезы: коллагена IV типа, матриксной металлопротеиназы 3-го типа (ММП-3), интерлейкина 1 β (ИЛ-1 β).

Для проведения исследования пациентке был назначен прием в утреннее время, даны рекомендации утром перед визитом не умывать-ся, стараться не тереть глаза, не закапывать никаких капель. Забор слезной жидкости был проведен по предложенному способу, зафиксированному в рационализаторском предложении «Способ забора слезной жидкости для исследования», удостоверение № 252/59 от 04.11.2020. Стерильную полоску фильтровальной бумаги размером 5х35 мм, согнутую на расстоянии 5 мм от края, поместили за нижнее веко правого глаза в наружной трети глазной щели таким образом, чтобы избежать соприкосновения с роговицей. После этого пациентку попросили сомкнуть веки на 5 минут, в течение которых слезная жидкость пропитывала полоску. Затем врач-исследователь извлек ее и зафиксировал длину зоны смачивания полоски, составившую 35 мм, поместил пропитанную

часть полоски в пробирку «Эппендорф», содержащую 500 мкл физиологического раствора. Пробирку закрыли, доставили в лабораторию, выполнили центрифугирование пробы при 3000 оборотов в минуту в течение 10 минут на общеклинической центрифуге с целью элюирования компонентов слезной жидкости в физиологический раствор.

Определение концентрации аналитов в образцах слезной жидкости проводится в соответствии с установленными методами с учетом коэффициента разведения слезы физиологическим раствором. С этой целью необходимо провести расчет исходного объема забранной для исследования слезы: поскольку 1 мм пропитанной слезной жидкостью полоски соответствует 1 мкл ее объема, то фактический объем полученной слезы ($V_{\text{слезы}}$) в мкл равен длине смоченной зоны полоски в 35 мм, что составило 35 мкл. Конечный объем образца ($V_{\text{образца}}$) для лабораторного анализа включает объем забранной слезной жидкости и объем физиологического раствора в 500 мкл, который использовали для разведения, что составило 535 мкл:

$$V_{\text{образца}} = V_{\text{слезы}} + 500 \text{ мкл} = 35 \text{ мкл} + 500 \text{ мкл} = 535 \text{ мкл}$$

Коэффициент разведения ($K_{\text{разв}}$) образца слезной жидкости рассчитывают по формуле:

$$K_{\text{разв}} = \frac{V_{\text{образца}}}{V_{\text{слезы}}}$$

Соответственно, коэффициент разведения составил $535 / 35 = 15,3$ усл. ед.

Конечное содержание аналитов непосредственно в слезе ($C_{\text{слез}}$) рассчитывали исходя из установленной лабораторными методами концентрации такового в образце слезы ($C_{\text{обр}}$) с учетом $K_{\text{разв}}$:

$$C_{\text{слез}} = C_{\text{обр}} \times K_{\text{разв}}$$

Показатели концентрации коллагена IV, ММП-3 и ИЛ-1 β в исследуемом образце биологической жидкости, определенные лабораторным методом ИФА, составили соответственно 419 нг/л, 1,6 нг/л и 2,3 нг/л. С учетом коэффициента разведения, составившего 15,3 усл. ед., конечное содержание в слезе правого глаза пациентки Н. коллагена IV, ММП-3 и ИЛ-1 β было соответственно 6410,7 нг/л (6,41 мкг/л), 24,5 нг/л и 35,2 нг/л, что свидетельствует о наличии патологического процесса в роговице, носящего, судя по клинико-патогенетической значимости использованных тестов, деструктивно-воспалительный характер.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемый способ забора слезной жидкости для исследования по сравнению с другими способами отличается минимальной травматичностью, безопасностью, в том числе подходит для пациентов с выраженным дефицитом водной части слезы. Данный способ характеризуется доступностью, легко выполним, расширяет возможности проведения

лабораторных исследований слезной жидкости у пациентов с недостаточностью слезопродукции.

Осуществление валидации способа забора слезной жидкости для лабораторного исследования подтвердило данные литературы о соответствии 1 миллиметра зоны полоски Ширмера, смоченной слезой, 1 микролитру слезной жидкости. Полученные результаты испытаний удовлетворяли критериям правильности, сходимости и воспроизводимости. Определен порядок проведения преаналитического и аналитического этапов лабораторного исследования слезной жидкости.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование текста – Ситник Г.В.; концепция исследования, редактирование текста – Камышников В.С.; дизайн исследования – Лебедева П.А.; проведение исследования, статистическая обработка результатов, написание текста – Степанова Ю.И.; обзор литературных данных, написание текста – Алехнович Л.И.; проведение исследования – Юрага Т.М.

Authors' contribution: research concept and design, text editing – Sitnik H.; research concept, text editing – Kamyshnikov V.; design – Lebedeva P.; conducting research, statistical processing of results, writing text – Stepanova Yu.; review of literature data, text writing – Alekhovich L.; conducting research – Yuraga T.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Tiffany J.M. (2008) The normal tear film. *Dev. Ophthalmology*, vol. 41, pp. 1–20.
2. Mishima S., Gasset A., Klyce S.D., Baum J.L. (1966) Determination of tear volume and tear flow. *Invest Ophthalmology*, vol. 5, pp. 264–276.
3. Zhou L., Beuerman R.W. (2012) Tear analysis in ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res.*, vol. 31, no 6, pp. 527–50.
4. Rentka A., Koroskenyi K., Harsfalvi J. (2017) Evaluation of commonly used tear sampling methods and their relevance in subsequent biochemical analysis. *Ann Clin Biochem*, vol. 54, no 5, pp. 521–529.
5. Hagan S., Martin E., Enriquez-de-Salamanca A. (2016) Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *EPMA J.*, vol. 7, pp. 9–15.
6. Hümmert M.W., Wurster U., Böniig L. (2019) Investigation of Oligoclonal IgG Bands in Tear Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunology*, vol. 10, p. 1110.
7. Avilov V., Zeng Q., Shippey S.A. (2016) Threads for tear film collection and support in quantitative amino acid analysis. *Anal Bioanal Chem.*, vol. 408, no 19, pp. 5309–17.
8. Choy C.K., Cho P., Chung W.Y. (2001) Water-soluble antioxidants in human tears: effect of the collection method. *Invest Ophthalmol Vis Science*, vol. 42, no 13, pp. 3130–4.
9. Small D., Hevy J., Tang-Liu D. (2000) Comparison of tear sampling techniques for pharmacokinetics analysis: ofloxacin concentrations in rabbit tears after sampling with Schirmer tear strips, capillary tubes or surgical sponges. *J Ocul Pharmacol Therapy*, vol. 16, no 5, pp. 439–46.
10. Cho P., Yap M. (1993) Schirmer test. A review. *Optom Vis Science*, vol. 70, no 2, pp. 152–6.
11. Stuchell R.N., Feldman J.J., Farris R.L. (1984) The effect of collection technique on tear composition. *Invest Ophthalmol Vis Science*, vol. 25, pp. 374–7.
12. Ohashi Y., Dogru M., Tsubota K. (2006) Laboratory findings in tear fluid analysis. *Clin Chim Acta.*, vol. 369, no 1, pp. 17–28.
13. Posa A., Bräuer L., Schicht M. (2013) Schirmer strip vs. capillary tube method: non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. *Ann Anat.*, vol. 195, no 2, pp. 137–42.
14. Denisin A.K., Karns K., Herr A.E. (2012) Post-collection processing of Schirmer strip-collected human tear fluid impacts protein content. *Analyst*, vol. 137, p. 5088.
15. Wolffsohn J.S. (2017) TFOS DEWS II diagnostic methodology report. *Ocular Surface*, vol. 15, pp. 539–574.
16. Tohru S., Takako O., Akiko I. (2014) Simultaneous study of matrix metalloproteinases, proinflammatory cytokines, and soluble cytokine receptors in the tears of noninfectious corneal ulcer patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.*, vol. 252, pp. 1451–1456.
17. Brzheshkii V.V., Egorova G.B., Egorov E.A. (2016) *Dry eye syndrom and ocular surface diseases: clinic, diagnosis, treatment*. Moscow: GEOTAR-Media, 342 p. (in Russian)
18. Council for Standardization, Metrology and Certification: Belarus Institute of Standardization and Certification (2002) *Accuracy (correctness and precision) of methods and results of measurements. Part 2. The main method for determining the repeatability and reproducibility of a standard measurement method: STB ISO 5725-2-2002*. Minsk: Interstate, 29 p.
19. Kamysnikov V.S. (2000) *Reference book on clinical and biochemical laboratory diagnostics: In 2 volumes. T 1*. Minsk: Belarus, 495 p. (in Russian)
20. Nosyrev P., Nosyreva M., Rasskazova T. (2003) Validation of analytical techniques: theory and practice. Part 1. *Remedium*, vol. 10, pp. 69–71.

Подана/Submitted: 18.10.2021

Принята/Accepted: 01.12.2021

Контакты/Contacts: cld@belmapo.by