

Биохимические методы исследования в КДЛ



Сапониновый метод и метод Сали.

До Н.Э.

Содержание гемоглобина оценивают визуально путем сравнения окраски исследуемого образца со стандартным раствором.

На результаты исследования влияет очень много факторов:

содержание белков крови;

количество билирубина в крови;

характер освещения и др.

Ошибка метода может достигать 30%.



Приборная диагностика

В клинической лабораторной диагностике широкое применение нашли **фотометрические методы** количественного анализа, основанные на переведении определяемых компонентов в поглощающие свет соединения с последующим определением их количеств путем измерения светопоглощения растворов.

Лучшими методами для определения гемоглобина, например, являются **гемиглобинцианидный и гемихромный**, обеспечивающие надежность и высокую точность количественного определения содержания гемоглобина в крови.



Типы приборных

методов

Фотометрия – совокупность оптических методов и средств измерения фотометрических величин светового потока. Основным понятием фотометрии является поток излучения, смысл которого в мощности переносимого электромагнитного (оптического) излучения.

Спектрофотометрия - определение зависимости фотометрических величин от длины волны излучения .

Спектроскопия или эмиссионный спектральный анализ - определение излучательной способности веществ в зависимости от длины волны излучения.

Колориметрия - измерение без выделения узкого диапазона длин волн, то есть измеряются характеристики всего светового потока.



Приборы, регистрирующие поглощение света веществом - **фотометры**, регистрирующие отражение – **отражательные фотометры**.

Фотометрические методы применяются также в тех случаях, когда изучается способность веществ рассеивать (**нефелометрия**) и пропускать излучение (**турбидиметрия**), переизлучать поглощенное излучение (**флуориметрия**), изменять степень поляризации излучения при прохождении его через оптически активные вещества (**поляриметрия**).

Рефрактометрия изучает показатели преломления оптического излучения твердых, жидких и газообразных веществ в зависимости от длины волны излучения.

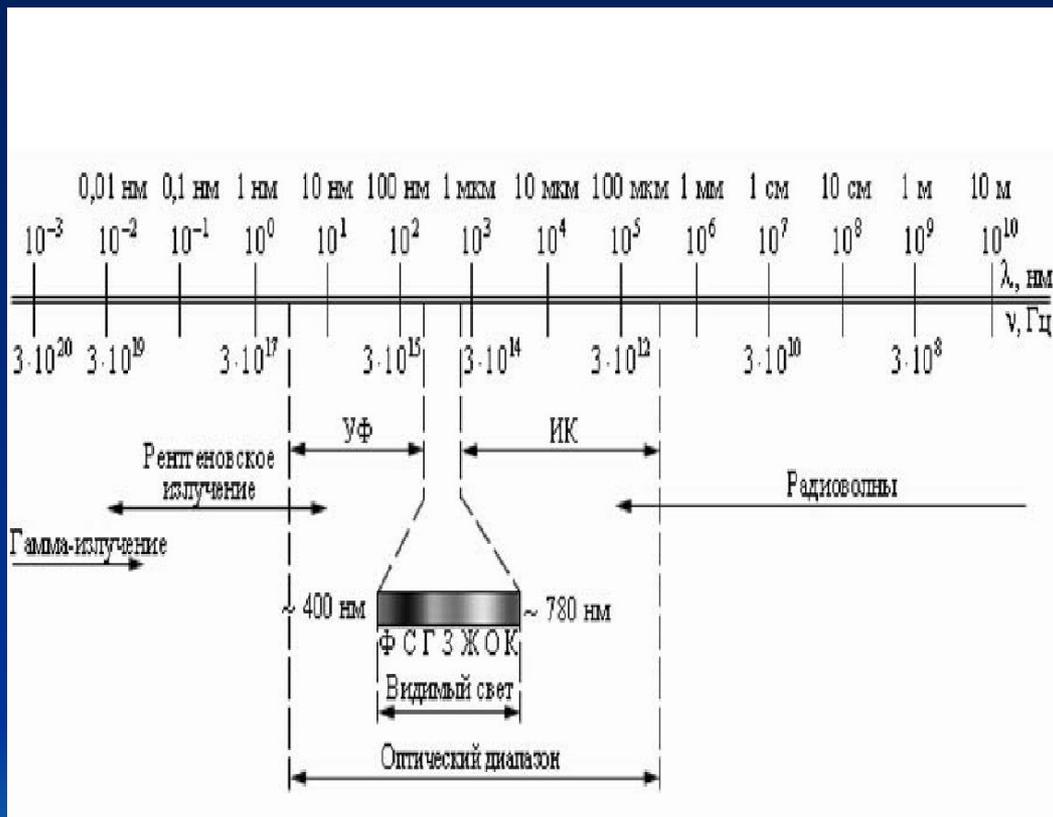
Потенциометрия объединяет методы, основанные на измерении ЭДС обратимых электрохимических цепей, когда потенциал рабочего электрода близок к равновесному значению.

Потенциометрия включает редоксметрию, **ионометрию** и потенциометрическое титрование.



Шкала электромагнитных волн.

Невидимое ультрафиолетовое излучение с длиной волны **до 380 нм.**



Область видимого излучения -
длина волны **от 380 нм до 780 нм.**

Невидимое инфракрасное излучение
- длина волны **больше 780 нм.**



Квантовые характеристики света

Свет испускается и поглощается веществом в виде строго определенных порций энергии - световых квантов - **фотонов**.

Линии, вдоль которых распространяется световая энергия, называются **лучами**.

Свет, в котором направления колебаний упорядочены каким-либо образом, называется **поляризованным**.

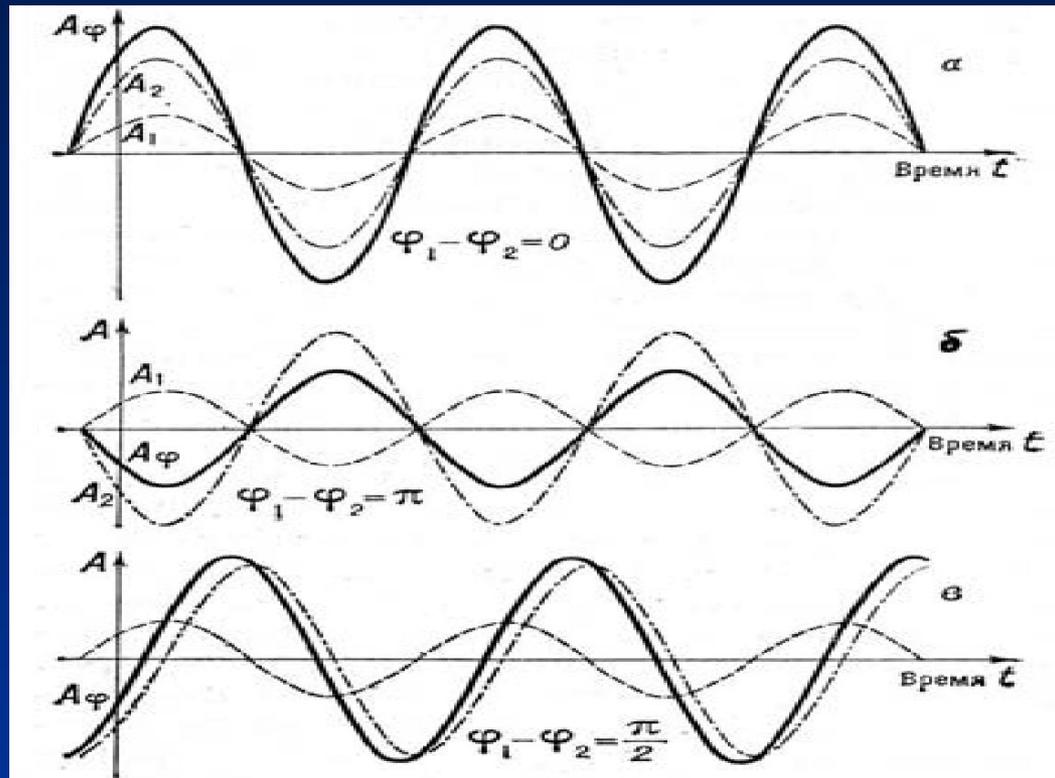
Основной волновой характеристикой света является **длина волны λ** , выражаемая в нм, мкм, или см.

Оптическое излучение какой-либо одной длины волны представляет собой **монохроматическое излучение**.

Когерентность – это согласованное протекание во времени и пространстве нескольких колебательных или волновых процессов, проявляющееся при их сложении. Колебания называются когерентными, если разность их фаз остается постоянной во времени, сложение колебаний определяет амплитуду суммарного колебания



Волновая теория света



Сложение колебаний двух световых волн (пунктир) с амплитудами A_1 и A_2 при различных фазах.

Результирующее колебание – сплошная линия.

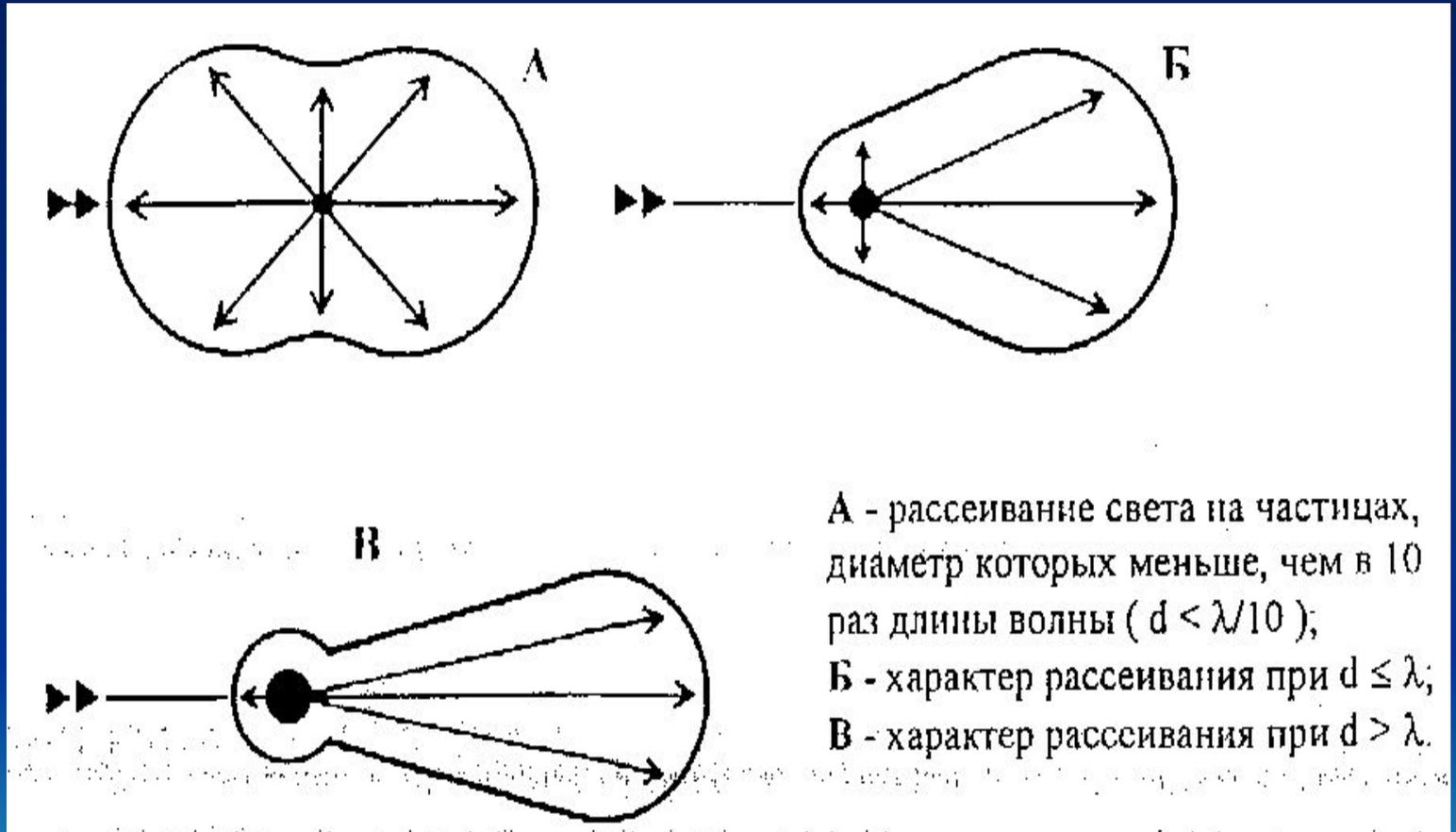


Нефелометрия

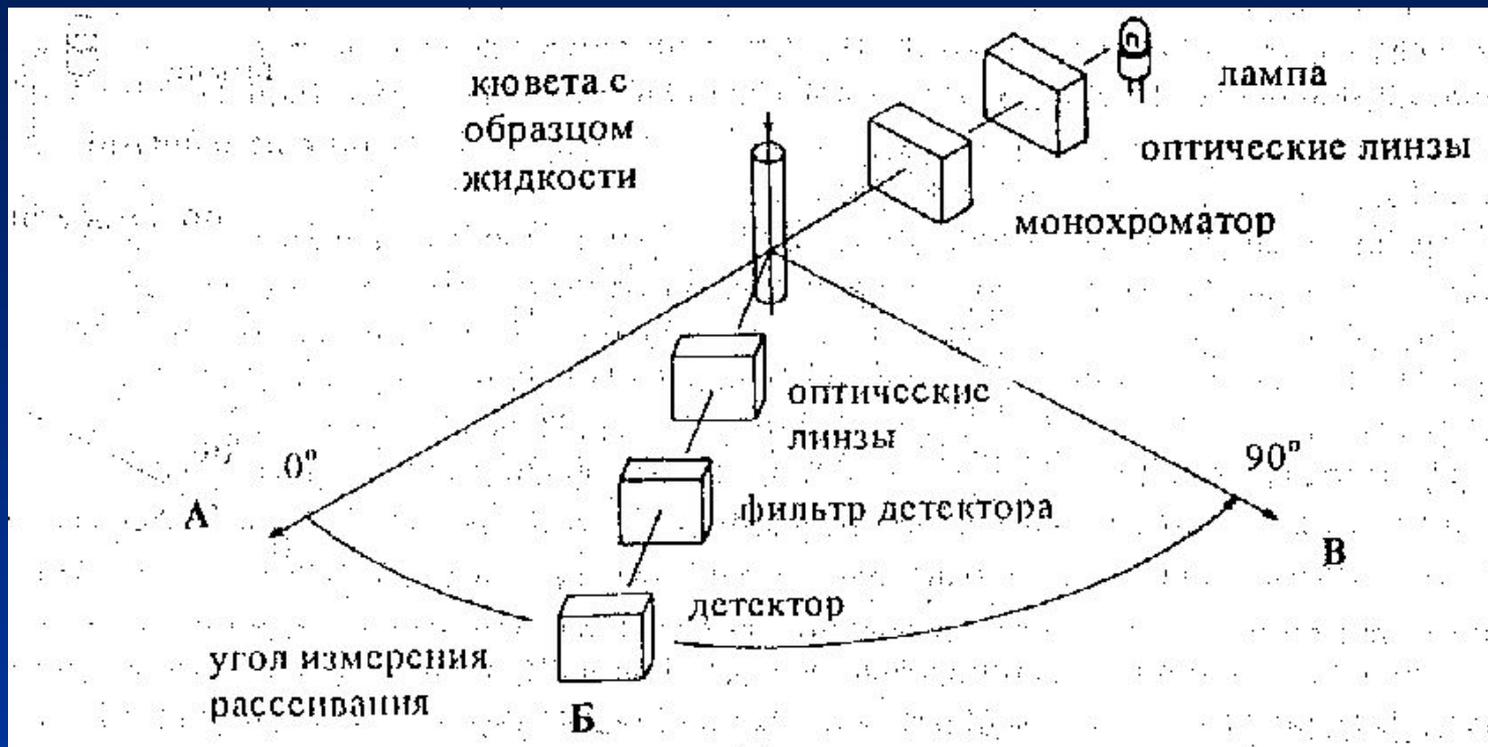
- **Нефелометрия** основана на феномене рассеивания света, когда падающий луч ударяется в частицу или комплекс антиген — антитело в растворе. В результате этого количество рассеянного света пропорционально количеству антигена.
- Нефелометрию типично используют для определения уровня специфических белков, которые, связываясь с антителами, образуют крестообразные частицы в растворе.
- Под нефелометры обычно специализированы отдельные анализаторы, имеющие ограниченное меню тестов, поскольку принцип рассеивания света применим только для молекул размером не больше 40 нм.



Определение светорассеивания



Нефелометрия-измерение рассеянного света



Принципиальная схема нефелометра/турбидиметра

А- турбидиметр;

Б- нефелометр, регистрирующий малоугловое рассеивание;

В - нефелометр, регистрирующий рассеивание под углом 90°



- Нефелометрия-измерение рассеянного света. Если известны размеры частиц , то интенсивность рассеянного света при **фиксированном угле** измерения будет пропорциональна концентрации вещества. **Приборы для нефелометрии программируются под измерение определенных компонентов биологической жидкости.**



МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

ИДЦ

*АВТОМАТИЧЕСКИЙ
НЕФЕЛОМЕТР «BNProSpec»-*



Преимущества автоматической нефелометрии

- + ОДИНОЧНЫЙ АНАЛИЗ
- + ВЫСОКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ
- + ВЫСОКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ (ОСОБЕННО ВАЖНО ОКОЛО «НУЛЯ», НЕТ ЛОЖНЫХ ЗНАЧЕНИЙ)
- + ВЫСОКИЙ ДИНАМИЧЕСКИЙ ДИАПАЗОН

Спектр тестов автоматического нефелометра

α1-микροглобулин	β2-Микроглобулин	α2-Макροглобулин	Альбумин	Общий белок
Фибронектин	Цистатин С	Легкие цепи 'λ'	Легкие цепи 'κ'	Своб. легкие цепи
ASLO, RF, CRP sen	Церулоплазмин	α1-Гликопротеин	α1-Антитрипсин	ADNase, SAA
Гаптоглобин	Ретинол св. белок	Преальбумин	Трансферрин	Миоглобин
АРО А-I	АРО-B	АРО-E	LP(a)	АРО А-II
IgG, IgE	IgA, IgM	IgG1, IgG2	IgG3, IgG4	ЦИК
С3с, С4	С1-ингибитор	Плазминоген	Фибриноген	Антитромбин-III
Гемопексин	Раств. трансф. рец.	Трансферрин, СДТ	Ферритин	Гомоцистеин



- Турбидиметрия - измерение прошедшего света по закону Бугера- Ламберта (18 век). В качестве турбидиметра можно использовать боьшинство фотометров и биохимических анализаторов.



Фотометрия



*в современной
лаборатории*

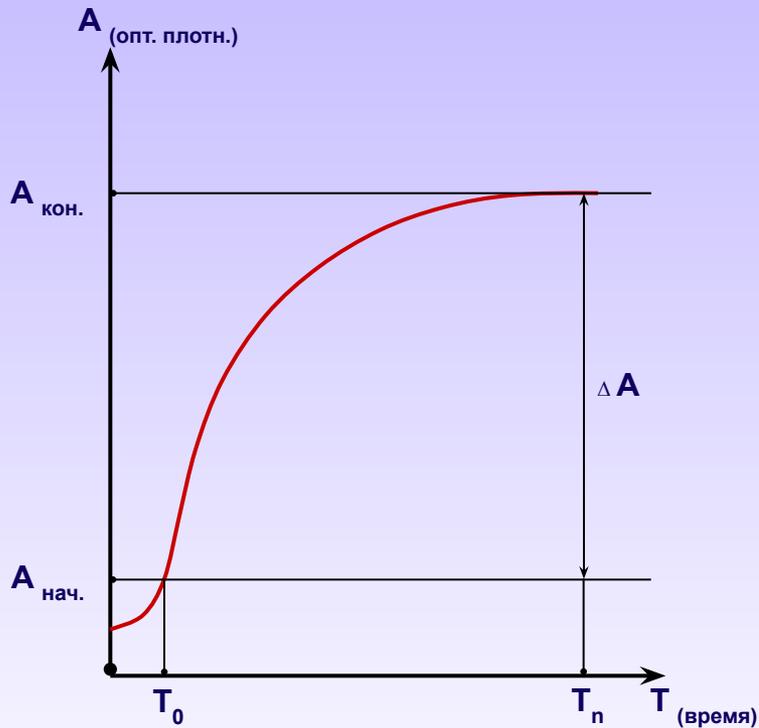


Измерения по «конечной точке»



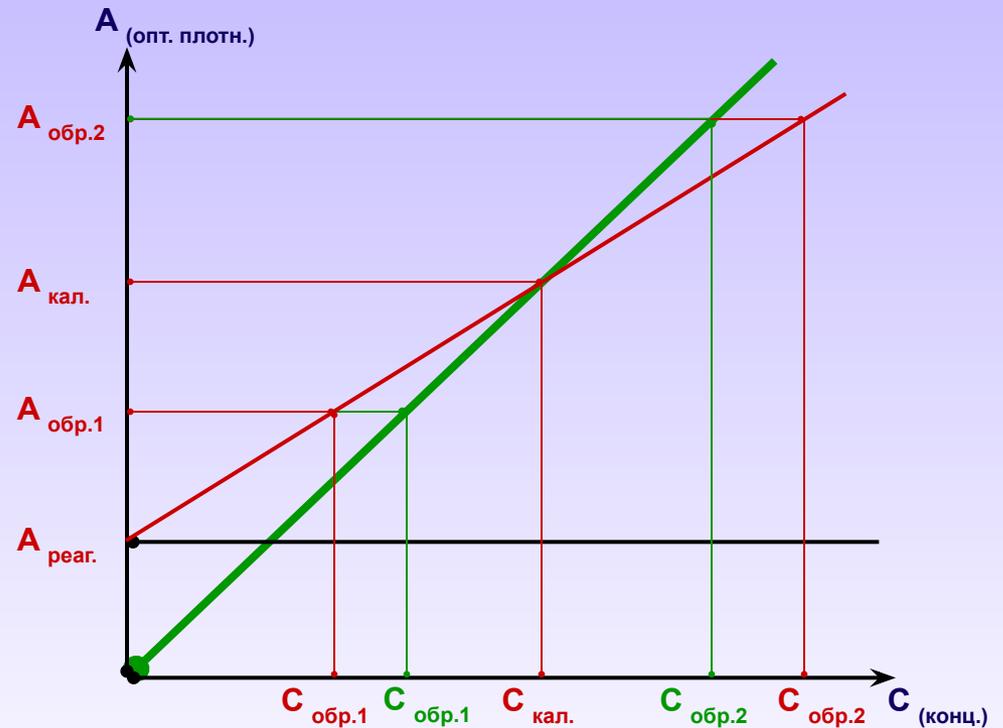
Кривая реакции

(изменение оптической плотности
в зависимости от времени)



Калибровочный график

(зависимость оптической плотности
от концентрации)



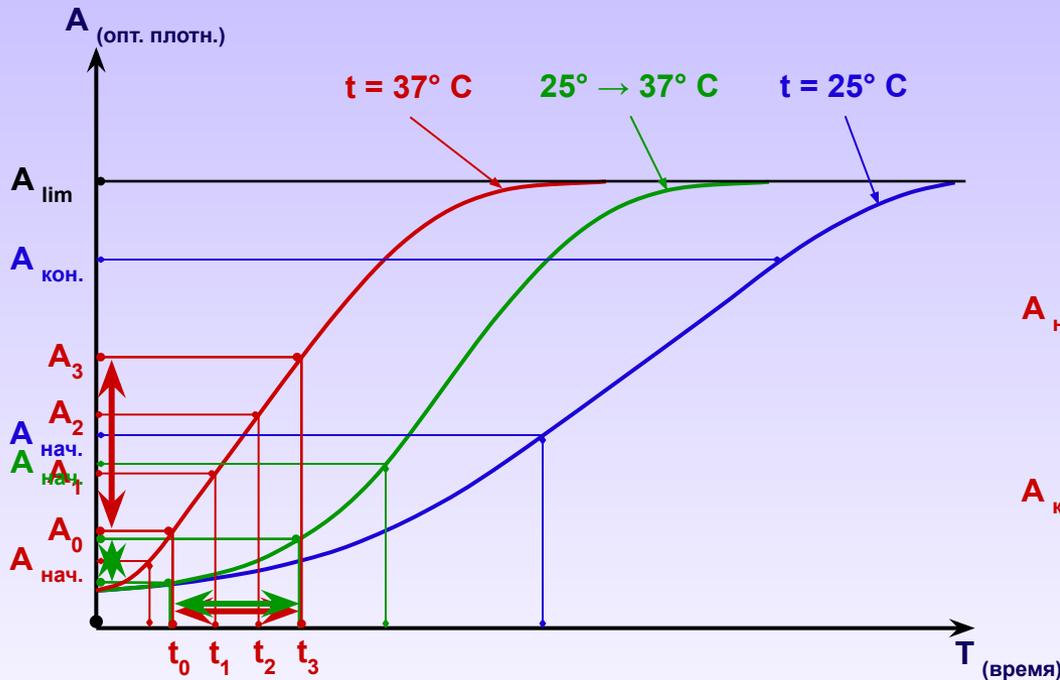
$$C_{\text{обр.}} = \frac{A_{\text{обр.}} - A_{\text{реаг.}}}{A_{\text{кал.}} - A_{\text{реаг.}}} \times C_{\text{кал.}}$$

Кинетические измерения



Кривая реакции

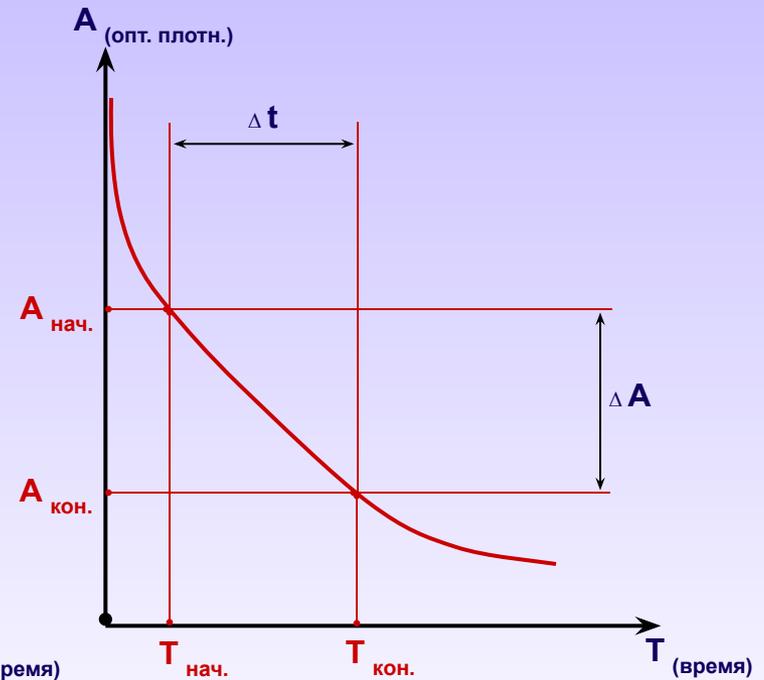
(увеличение оптической плотности в зависимости от времени)



$$C_{\text{обр.}} = \frac{(A_1 - A_0) + (A_2 - A_1) + (A_3 - A_2)}{t_3 - t_0} \times F$$

Кривая реакции

(уменьшение оптической плотности в зависимости от времени)

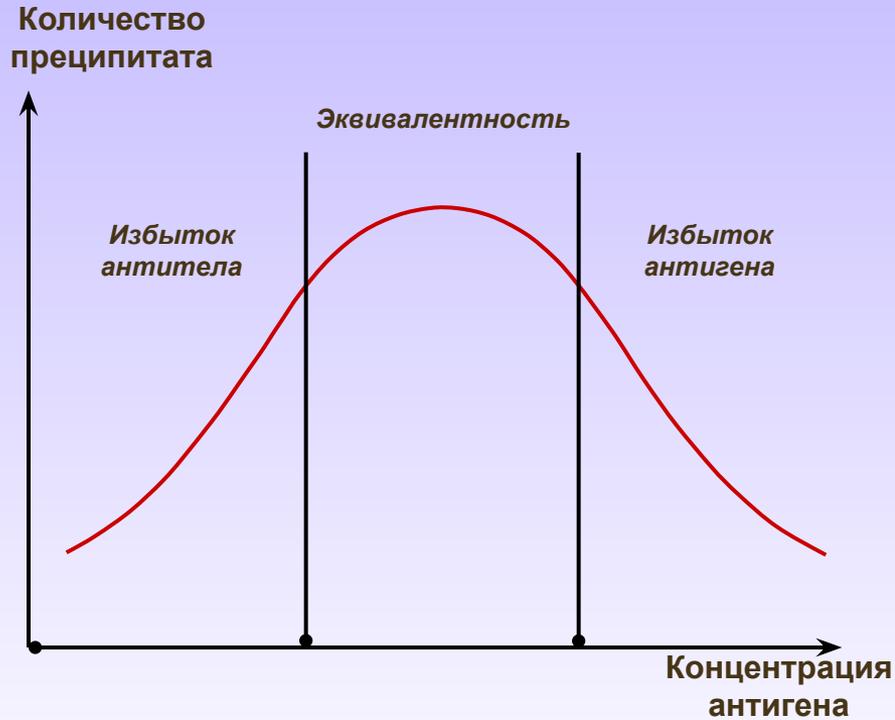


Нелинейная многоточечная калибровка



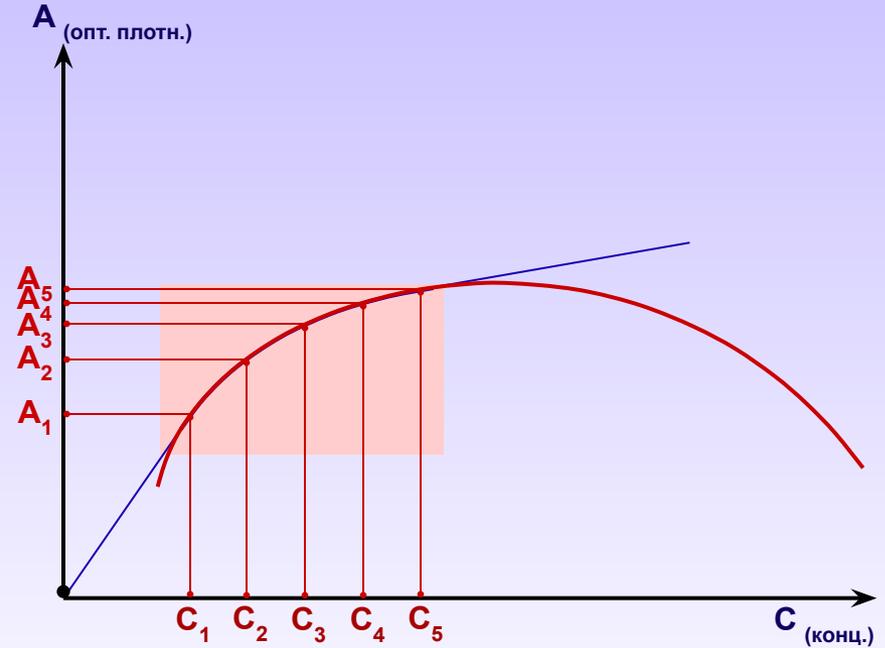
Кривая реакции

(изменение оптической плотности в зависимости от времени)



Калибровочный график

(зависимость оптической плотности от концентрации)



Что же такое современный фотометр?



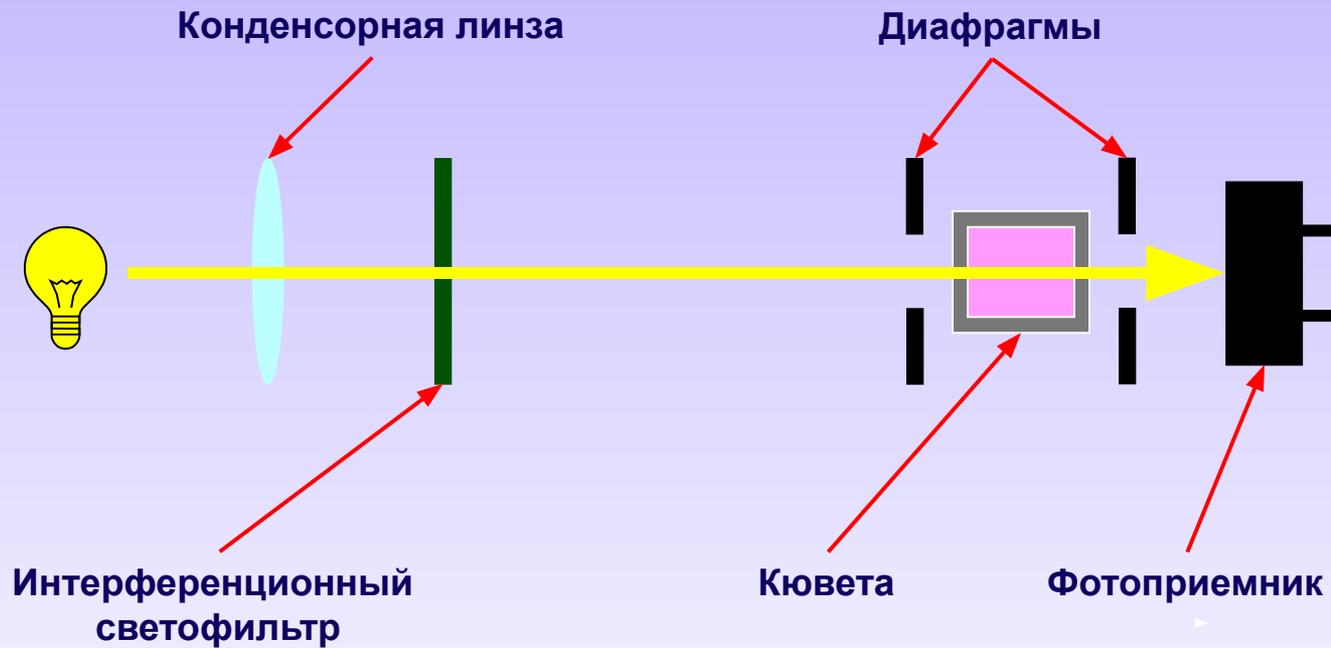
Требования

предъявляемые к современному фотометру:

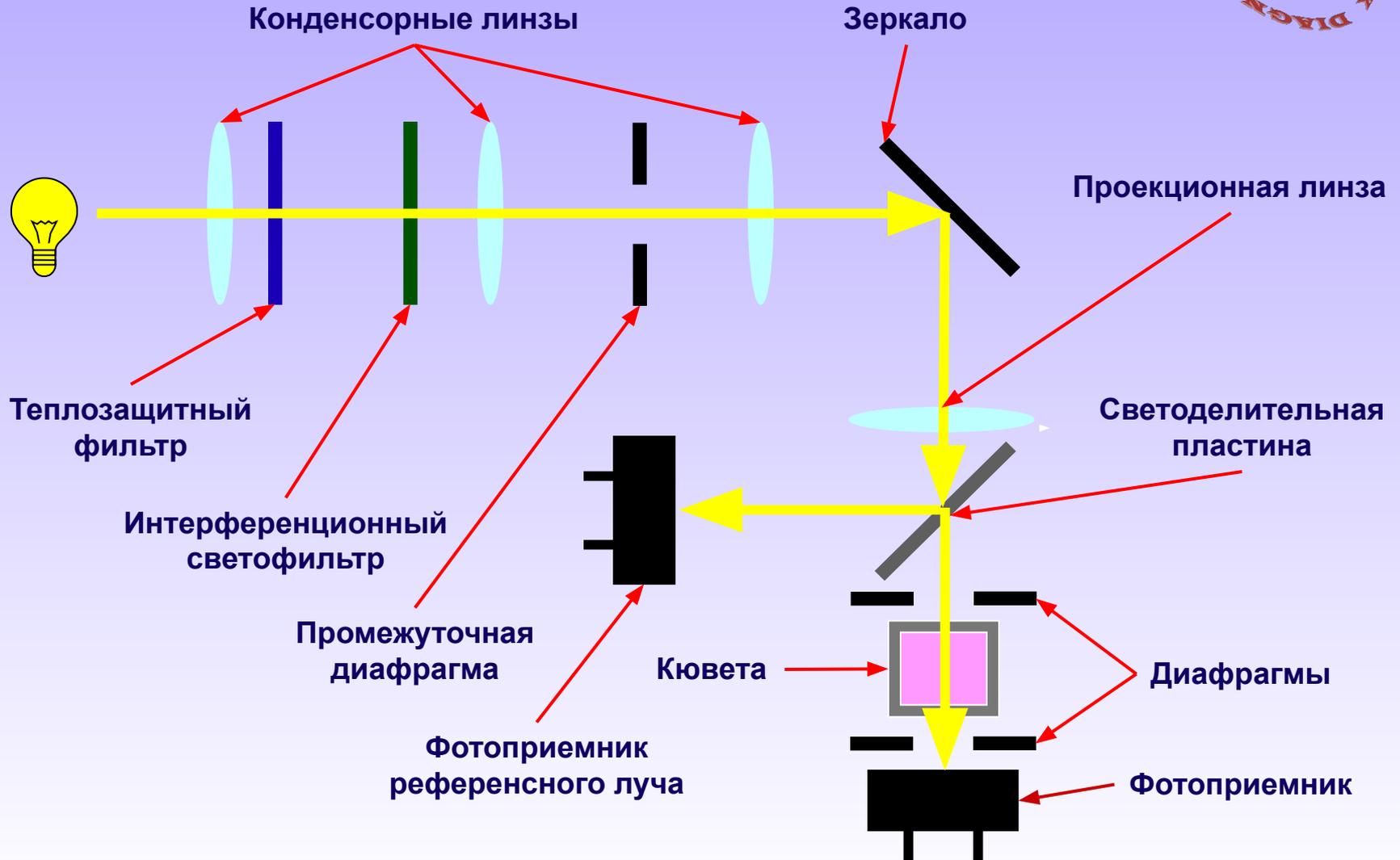


- Низкая стоимость.
- Простота эксплуатации и удобный интерфейс.
- Возможность программирования.
- Возможность кинетических измерений.
- Малый объем реакционной кюветы.
- Совместимость с компьютером.
- Гарантийное и послегарантийное обслуживание.
- Наличие или возможность подключения проточной кюветы.
- Высокая точность измерений.

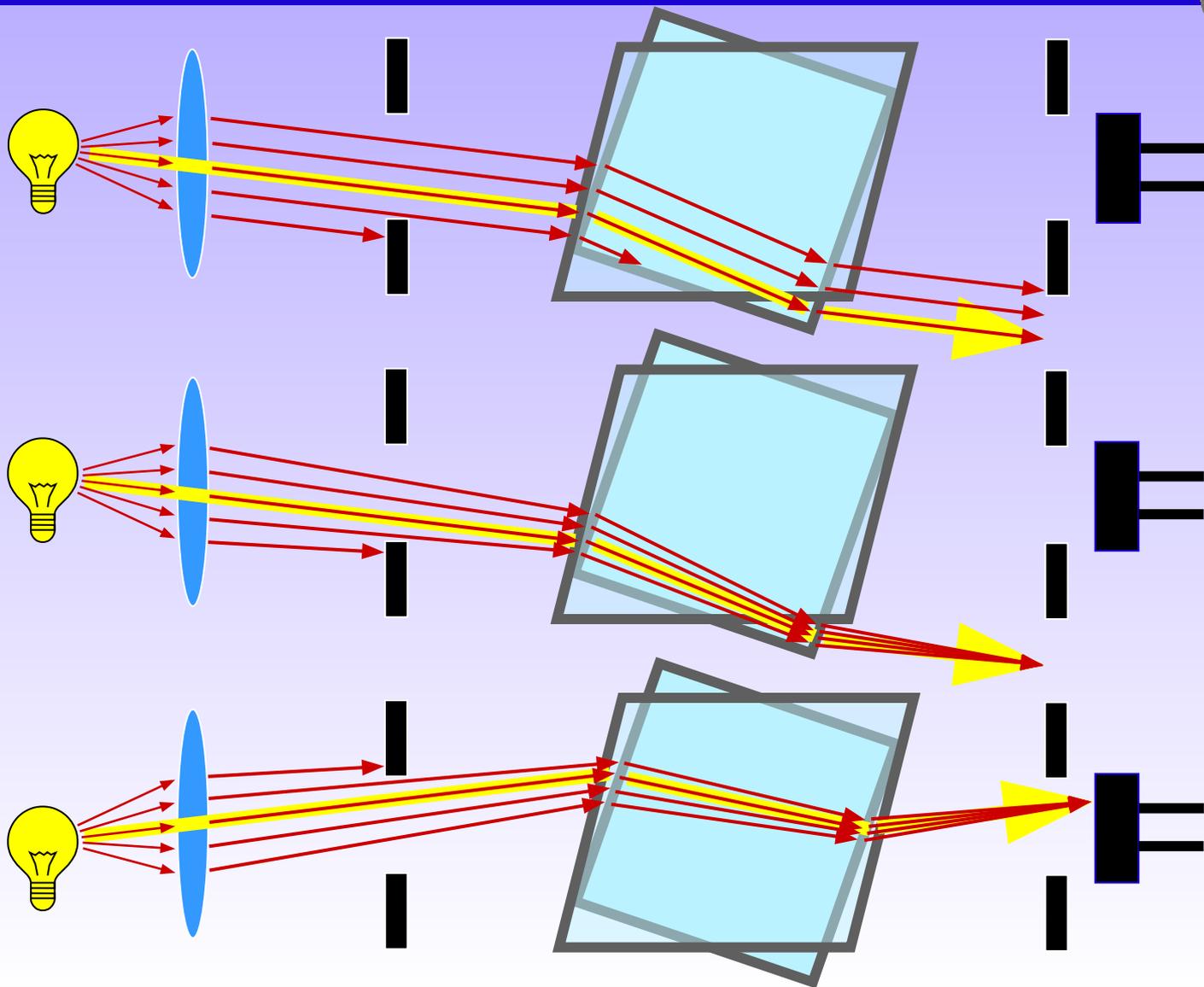
Упрощенная оптическая схема фотометра



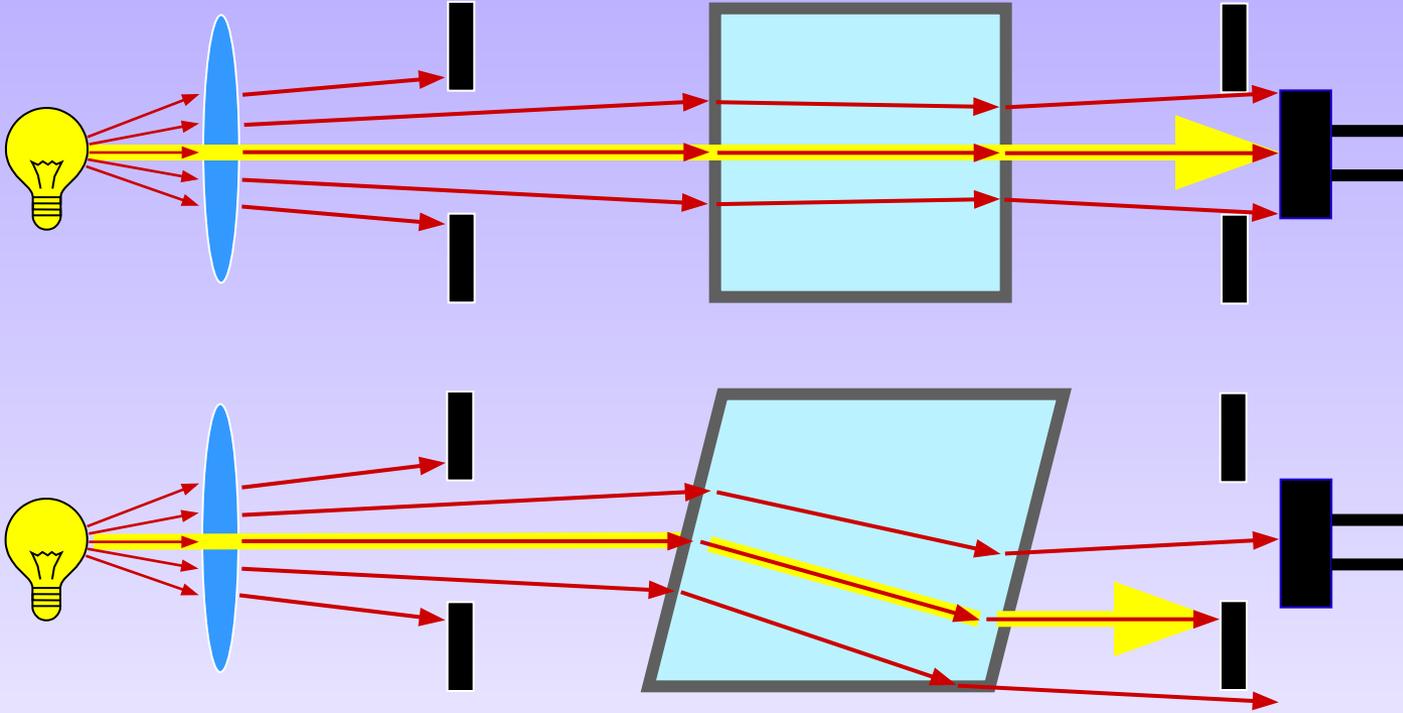
Классическая оптическая схема фотометра



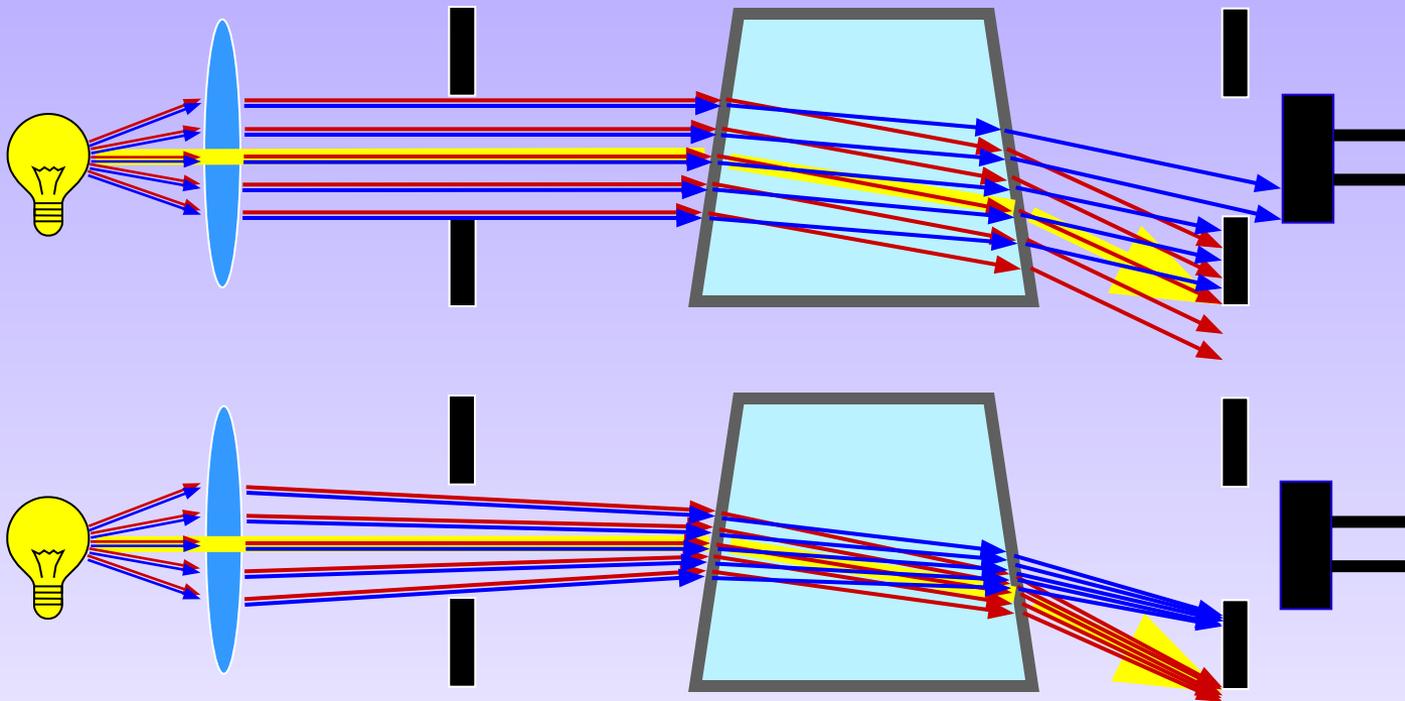
Влияние юстировки лампы



Влияние квазипараллельности светового потока



Влияние квазипараллельности светового потока и длины волны



Ольвекс Диагностикум представляет

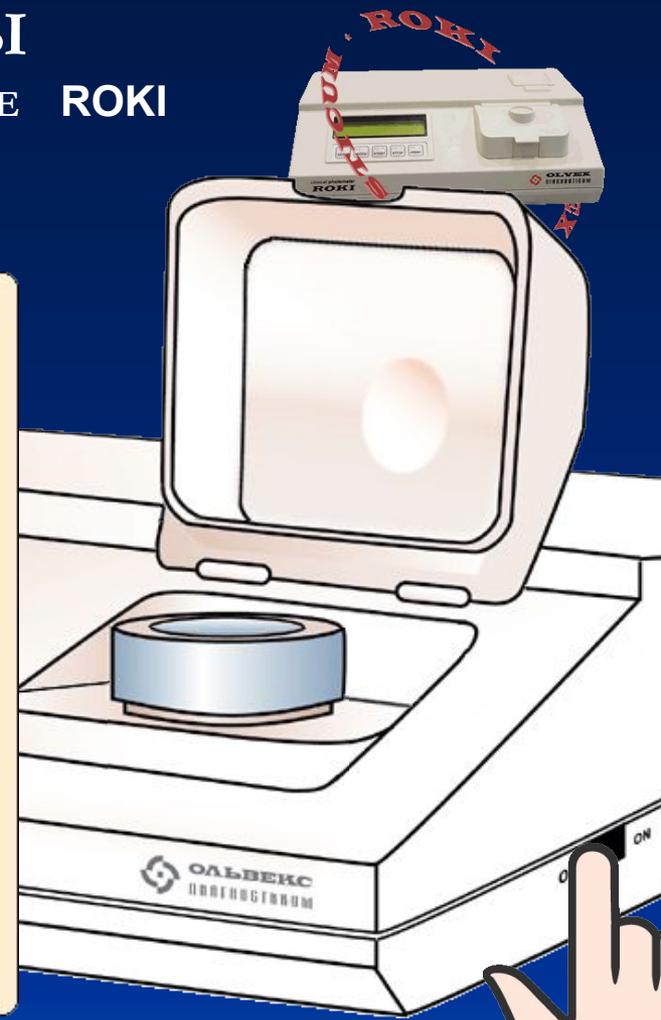


ROKI

Биохимический анализатор

ПОРЯДОК РАБОТЫ НА БИОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ ROKI

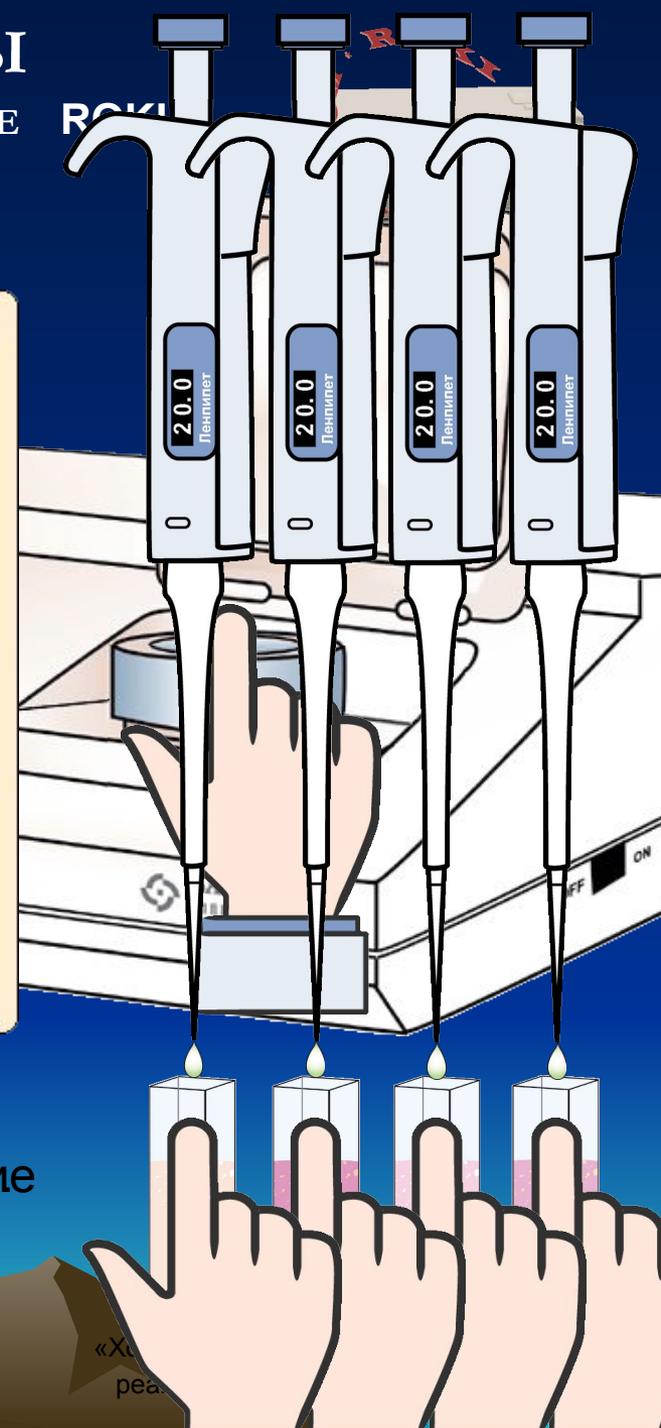
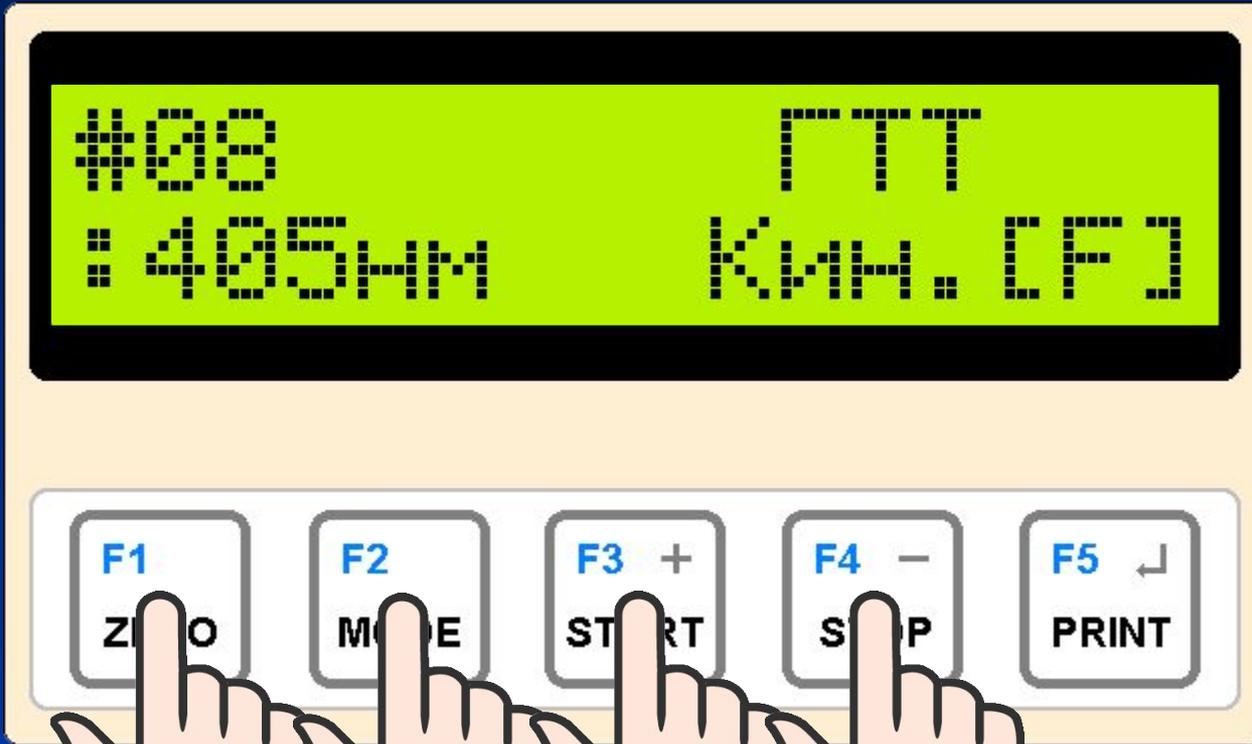
ВКЛЮЧЕНИЕ ПРИБОРА И ВЫБОР МЕТОДИКИ



Для включения прибора необходимо нажать кнопку F2 «МО» и выбрать метод работы F4 «ГЛЮК». В режиме F4 прибор работает в режиме «КоН. Т. [5]» при температуре 37° С.

ПОРЯДОК РАБОТЫ НА БИОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ

ИЗМЕРЕНИЕ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

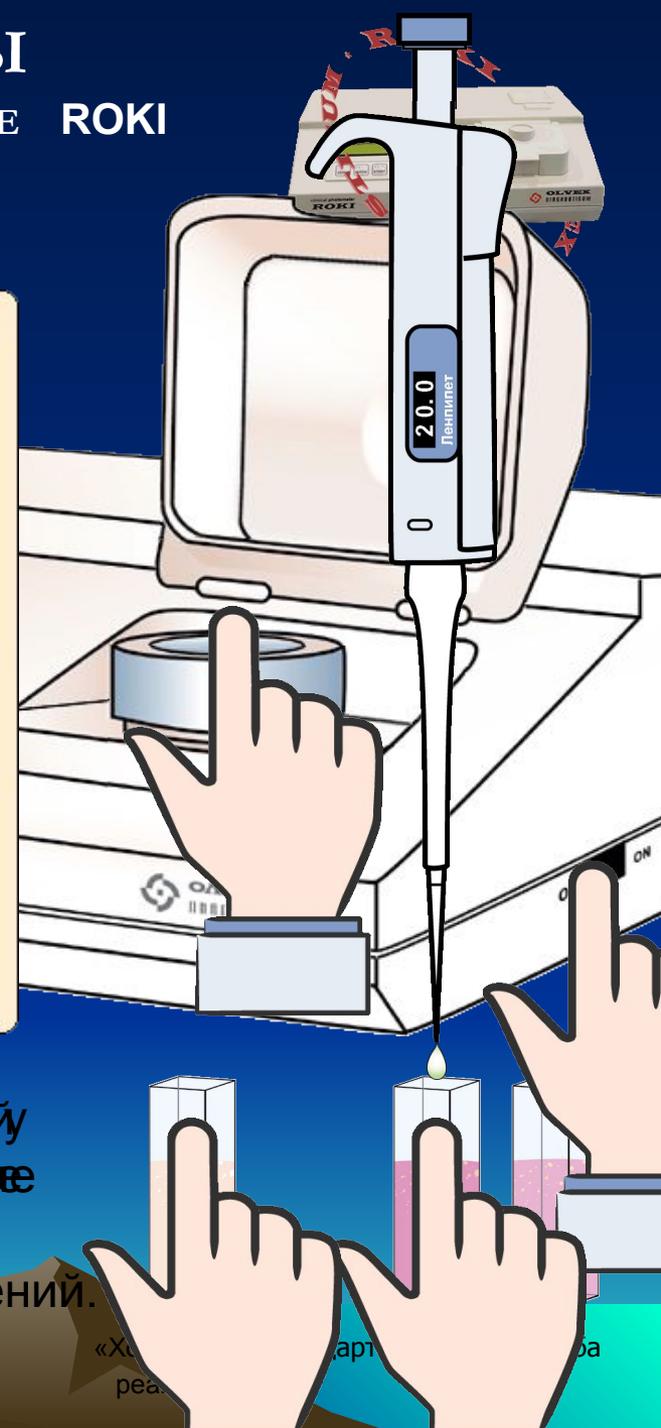
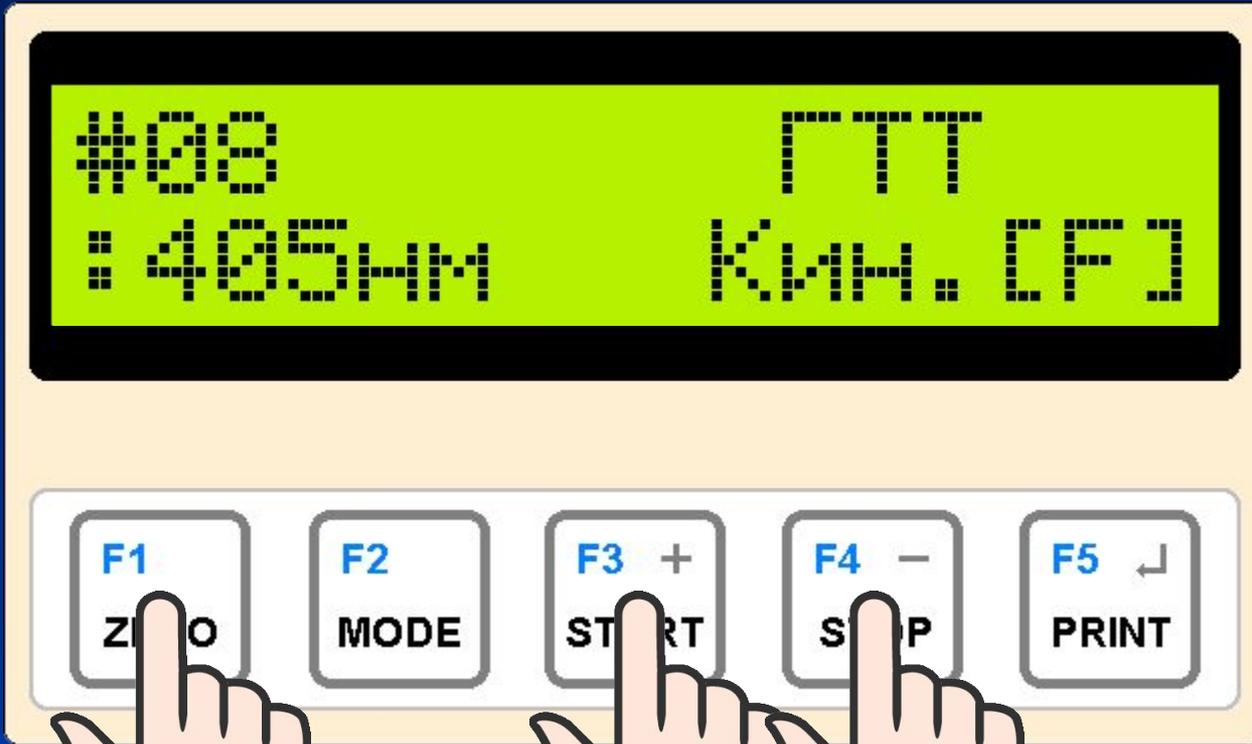


Действием клавиш F1, F2, F3, F4, F5

«Хи...
rea...

ПОРЯДОК РАБОТЫ НА БИОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ ROKI

КИНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ



Добавление реагента в кювету осуществляется автоматически в заданном объеме. В зависимости от выбранной программы измерения прибор автоматически устанавливает длину волны измерения. При измерении кинетики прибор автоматически устанавливает длину волны измерения. При измерении кинетики прибор автоматически устанавливает длину волны измерения.

«Х...»
part
ба
rea

Некоторые цифры



**Цифры, на которые стоит
обратить внимание!!!**

Около 80% биохимических исследований проводимых в месяц в России, приходится на фотометры старого поколения. Цифры говорят сами за себя.

Многофункциональные фотометры

Наряду с одно- и двухканальными появились и многоканальные фотометры, позволяющие измерять одновременно большое количество проб, что существенно ускоряет процесс измерения.



Преимущества автоматизированных фотометров

- Главной отличительной особенностью автоматических фотометров (спектрофотометров) от **автоматических анализаторов** является необходимость вручную смешивать анализируемый образец с реактивами.



Причины использования автоматических анализаторов

1. Экономичность- 350 - 500 мкл (и менее) реагентов (!)
2. Объем анализируемой биологической жидкости (3 - 7 мкл)
3. Высокая производительность (до 800 и более исследований в час).
4. Автоанализатор может эксплуатироваться не менее 5-6 часов в сутки.
5. Возможностью использования разных режимов определения: по конечной точке, двух-многоточечной кинетике, с привлечением технологии турбидиметрии (иммунонефелометрии), ионометрии, поляризационной флюориметрии и других.
6. Возможность программирования под реактивы разных фирм-производителей.
7. Использование небольших (в том числе и моющихся) измерительных кювет.
8. Системный подход, который позволяет "просмотреть" сам ход реакции, выявить фазу исчерпания субстрата, кофакторов (при "ручном" определении это обнаружить невозможно).
9. Осуществление контроля качества.
10. Программное сохранение базы данных.
11. Возможность выполнения экстренных исследований.
12. Связь с компьютерами, выход в ЛИС.
13. Широкие возможности измерительного модуля. позволяют регистрировать абсорбцию (при условии соблюдения закона Бугера-Ламберта-Бееера) в диапазоне до 2,5 ед. А, что обусловлено мощным источником облучения и более чувствительным приемником света.
14. Использование неагрессивных жидкостей (Ферментные наборы реагентов).
15. Многие автоанализаторы оснащены ионоселективным блоком, позволяющим, в частности, проводить определения ионов калия, натрия, кальция, хлора потенциометрическим методом.



Анализаторы проточно-инжекторного типа (ПИА)

- В 60-ых годах XX века Я.Ружичка и Э.Хансен, К.Стюарт предложили новую разновидность непрерывного проточного анализа, а именно: проточно-инжекционный анализ (ПИА)
- По сравнению с непрерывным проточным анализом проточно-инжекционный анализ (ПИА) позволяет получить информацию не только о концентрации исследуемого образца, но и о кинетике протекаемой реакции.
- В проточно-инжекционном анализе в качестве способов детектирования используются: абсорбционная фотометрия (42%), флуориметрия, турбидиметрия и др. (28%), электрохимическая детекция (29%), иные способы детекции (около 1%).
- Использование ПИА позволяет значительно уменьшить объем биопробы и реагентов - за счет возможности осуществлять исследования в кинетическом режиме; обеспечивает высокую производительность системы при повышении точности анализа.



Воспроизводимость результатов

- **Воспроизводимость результатов** обеспечивается тем, что на каждый этап исследования всегда отводится один и тот же, притом строго определенный, промежуток времени. Результат анализа рассчитывается путем сопоставления показателей исследования опытной, контрольной и стандартной проб.



Режимы измерения

Характер измерения оптической плотности раствора оценивается в следующих режимах:

- а) по конечной точке (возможность построения калибровочной кривой);
- б) по кинетике;
- в) по двум точкам;
- г) по фиксированной абсорбции;
- д) оценка результатов по нелинейной калибровке (иммунотурбидиметрия).



Особенности оптической системы регистрации:

- а) **источник света** (ксеноновая, галогеновая лампа с длительным сроком эксплуатации, лампа накаливания (вольфрамовая, вольфрамо-галогеновая, ксеноновая, кварцевая, пульсирующая);
- б) **диапазон длин волн;**
- в) **монохроматизация светового потока** с помощью диффракционной решетки, набора простых или интерференционных светофильтров;
- г) **система детектирования** светового сигнала;
- д) **режим фотометрического измерения** – монохроматический или бихроматический.



Характер химической процедуры

В зависимости от характера химической процедуры исследований различают 4 основные группы методов ПИА.

- К 1-ой из них относят способы анализа, основанные на обычной "неферментативной" химической реакции.
- Ко 2-ой - способы определения субстратов с помощью ферментов.
- К 3-ей - методы исследования активности ферментов.
- К 4-ой - методы иммунохимического анализа.



Типы анализаторов

- 1. Одноцелевые биохимические автоанализаторы, с помощью которых в анализируемой пробе определяется лишь один компонент биологической жидкости и ткани. К числу таковых может быть отнесен, например, анализатор "Глюкоза-2" фирмы "Beckman".
- 2. Автоанализаторы для определения так называемых родственных компонентов. Это, например, автоанализатор аминокислот, принцип действия которого основан на хроматографическом их разделении (по Штейну и Муру); автоматический атомно-абсорбционный пламенный спектрофотометр.
- 3. Многоцелевые биохимические автоматические устройства, предназ начающиеся для установления содержания в биологических жидкостях большого количества различных по химической природе компонентов.



Дискретные анализаторы

В дискретных автоанализаторах вместо центрифугирования и диализа используется большое разбавление проб, при котором помехи от присутствия белков в большинстве реакций становятся ничтожно малыми.

Основными узлами дискретных автоанализаторов являются:

- 1). Карусели (картриджи) с исследуемым биологическим материалом и реагентами.
- 2). Дозаторы (манипуляторы).
- 3). Блок измерения концентрации определяемого компонента.
- 4). Регистрирующее устройство.
- 5). Система управления комплексом перечисленных модулей.



Альтернатива дискретным анализаторам



- Своеобразным «компромиссом», объединяющим проточный и дискретный принципы автоматизированного исследования, является **ротационная система**, особенность которой состоит в использовании процесса центрифугирования. При этом смешивание пробы с реактивами, термостатирование и измерение величины оптической плотности осуществляются в период вращения ротора центрифуги: в процессе центрифугирования жидкость перемещается по радиальным каналам ротора в соответствующие кюветы, вращающиеся совместно с ним.
- Подавляющее большинство применяемых в лаборатории автоанализаторов используют дискретный принцип исследования.



Классификация автоанализаторов в зависимости от особенностей технологии

- 1-ый класс. Автоанализаторы "ВАТСН-системы", т.е. выполнения исследований **"по тестам"**. Характерной их конструктивной особенностью является использование проточных кювет. Анализаторы этого типа предназначены для последовательного выполнения отдельных методик (серий исследований). Представляют собой открытые системы.
- 2-ой класс. Анализаторы селективные -режим работы **"по пациентам"** - RANDOM. Позволяют выполнять исследование по различным биохимическим тестам путем взятия (с использованием манипулятора) отдельных аликвот одной и той же пробы биологического материала. Как правило, регистрация оптической плотности производится не в проточной, а отдельной реакционной кювете. Приборы этого типа допускают возможность проводить экспресс-анализы (в STAT-режиме: "внеочередного проведения анализа").
- 3-ий класс. **Многофункциональные интеллектуальные системы**. Предназначаются для использования в лабораториях крупных лечебно-профилактических учреждений, диагностических центрах, централизованных клинико-биохимических лабораториях. Содержат **ионоселективные блоки**.



Основные параметры, на которые нужно обратить внимание при выборе анализатора:

- - **Производительность: количество исследований в час.**
- - **Последовательность выполнения анализов: "по тестам" - BATCH или "по пациентам" - RANDOM.**
- - **Открытость системы.**



Группы методов

- В зависимости от характера химической процедуры исследования различают 4 основные группы методов ПИА.
- К 1-ой из них относят способы анализа, основанные на обычной "неферментативной" химической реакции.
- Ко 2-ой - способы определения субстратов с помощью ферментов.
- К 3-ей - методы исследования активности ферментов.
- К 4-ой - методы иммунохимического анализа.



Сравнение иммуноферментного, иммунохемилюминесцентного и электрохемилюминесцентного методов детекции



История развития иммуно-химических методов анализа

- 60-е: радиоизотопные методы (высокая чувствительность и специфичность);
- 70-е: иммуноферментные методы (улучшенная стабильность реагентов, возможность автоматизации);
- 80-е: иммунохемилюминесцентные методы (сокращенное время инкубации, увеличенная чувствительность);
- 90-е: электрохемилюминесцентные методы.



Иммунохимические методы

При взаимодействии антигена и специфического иммуноглобулина (АГ) образуется высокомолекулярный комплекс. Можно определять АГ с помощью специфических АТ, можно определять АТ с помощью специфических АГ.



- 1) Методы преципитации в геле (иммунодиффузия).
- 2) Методы лигандного анализа.
- 3) Иммунотурбидиметрия.



Гомогенный и гетерогенный методы

Гетерогенный анализ отличается от гомогенного тем, что в реакционной смеси имеются две фазы- твердая(осадок, суспензия) и жидкая, что позволяет отделить комплекс от исходных компонентов.

Самый распространенный вариант гетерогенного анализа- это твердофазный, когда с самого начала один из компонентов реакции фиксирован на твёрдом носителе. Широко распространен вариант ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).



Определение индивидуальных белков на основе реакции взаимодействия антиген-антитело.

При взаимодействии АГ с АТ образуется иммунный комплекс, который может выпадать в виде преципитата. Реакция преципитации была использована в методе радиальной иммунодиффузии, предложена в 1964-65 гг. Манчини Карбонара и Херемансом.

Метод радиальной иммунодиффузии

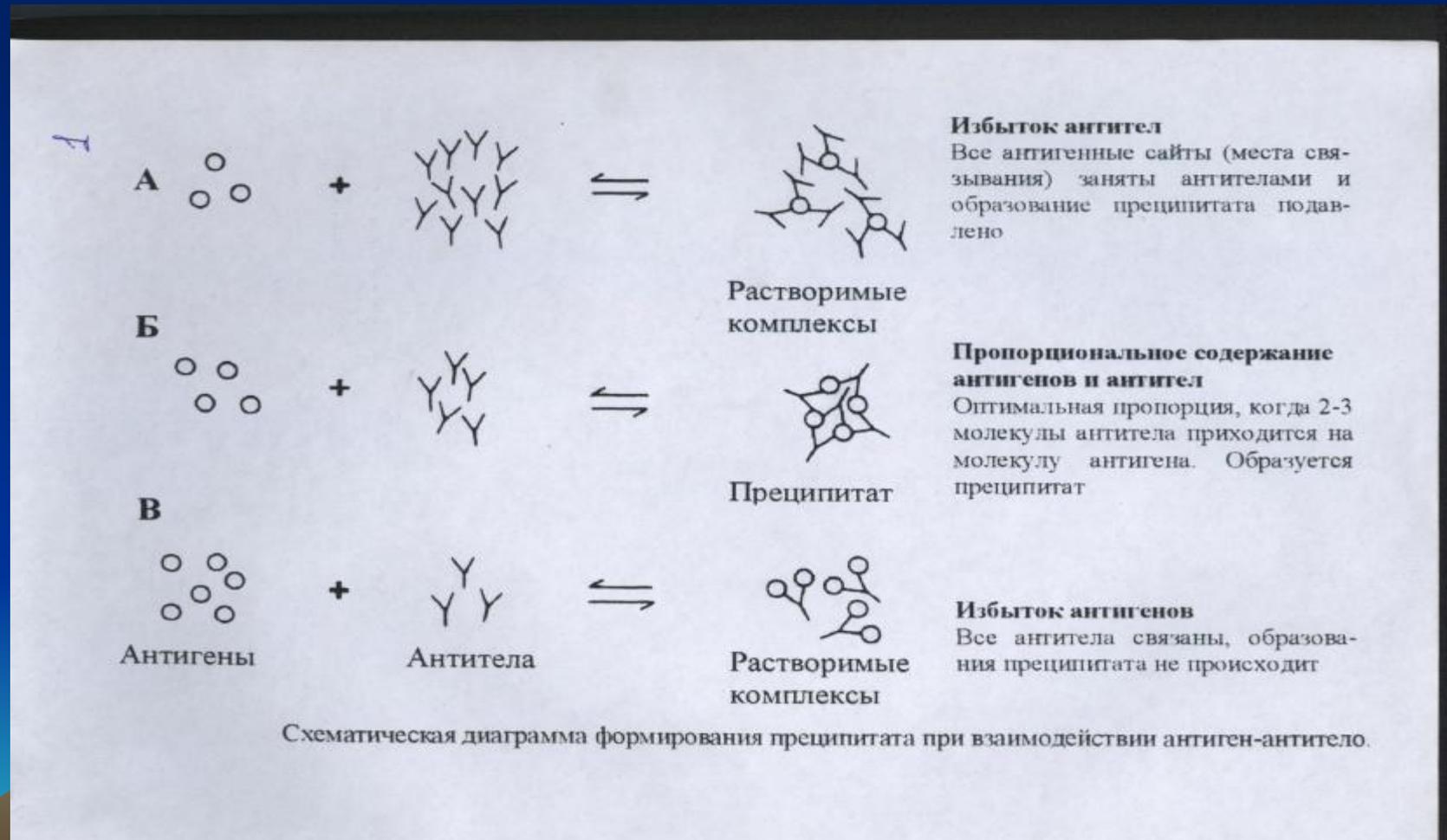
не требует специального оборудования, но он довольно длительный, не поддается автоматизации, несет определённую долю субъективизма.

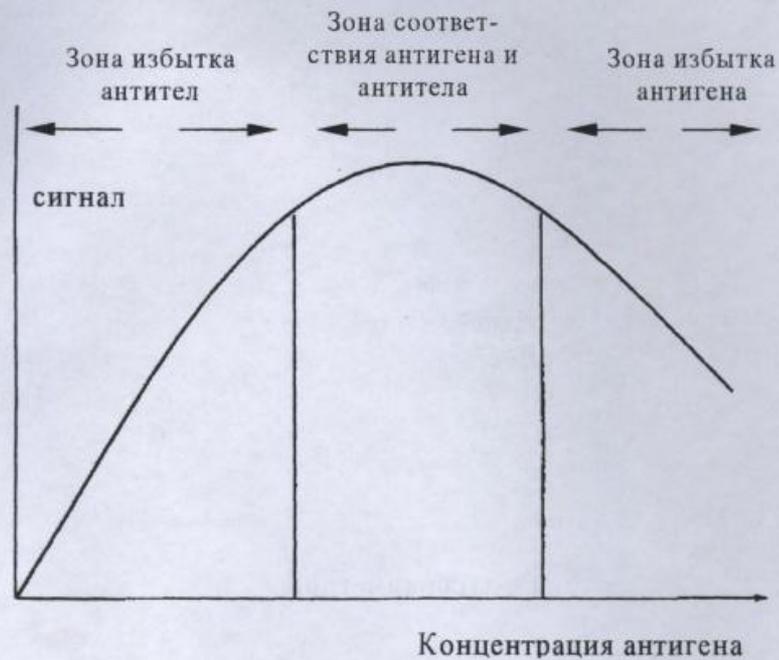


Реакция между АГ и АТ в жидкой фазе.

Метод турбидиметрии и нефелометрии.

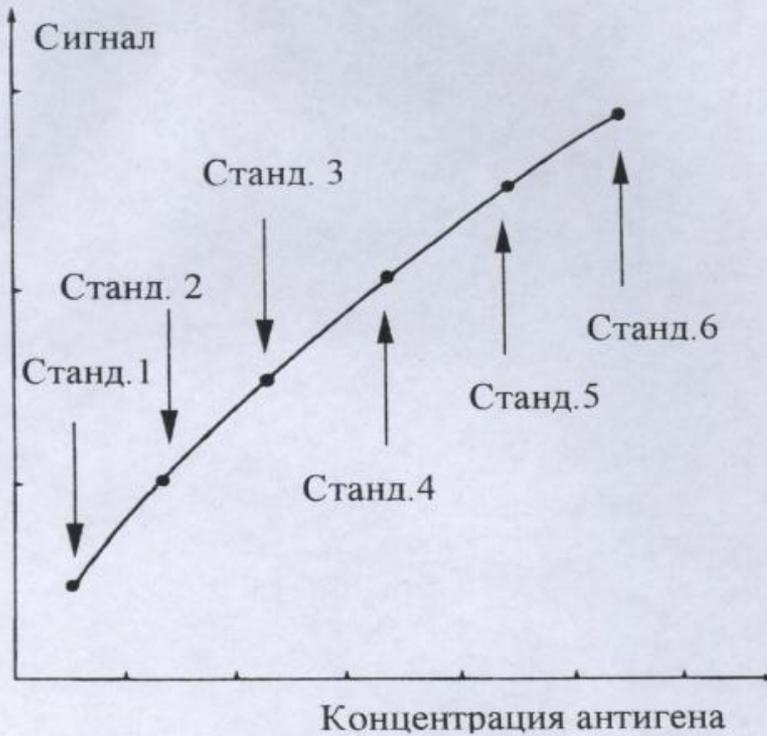
Реакция АГ-АТ проявляется в растворе в виде образования агрегатов.





Кривая доза-эффект при образовании комплексов антиген-антитело в иммунохимической реакции (кривая Хайделбергера-Кендаля)





Стандартная кривая.

Характерна для определения индивидуальных белков турбидиметрическим и нефелометрическим методами. Для построения кривой требуется по крайней мере 5 стандартных растворов антигена.



Лигандный анализ.

- специфическое связывание с лигандами как аналитический метод начинается с работы Ялоу и Берсон, предложивших в 1960 году метод радиоиммунологического определения (РИА) инсулина. Эта работа была удостоена Нобелевской премии.



- **В лигандном анализе выделяют три компонента:**

- 1) АНАЛИТ- определяемое вещество. Оно может содержаться в анализируемом материале, может быть добавлено в качестве калибратора и т.д..**
- 2) ЛИГАНД- вещество, избирательно связывающееся с аналитом.**
- 3) МЕТКА- легкоопределяемое соединение, добавляемое в аналитическую систему для измерения количества аналита.**



- **ЭТАПЫ:**

1. **Взаимодействие аналита с лигандом.**
2. **Формирование меченного комплекса.**
3. **Измерение сигнала (определение количества метки).**



ОСНОВНЫЕ АНАЛИТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ:

- 1. Прямые- определяется количество комплекса аналит- лиганд. При увеличении концентрации аналита сигнал возрастает.
- 2. Непрямые- определяется количество оставшихся свободными валентностей лиганда.



Иммуноферментный анализ

Метод выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса антиген-антитело за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску.



Иммуноферментный анализ

Существует множество вариантов постановки ИФА, из которых наибольшее практическое значение получил гетерогенный твердофазный иммуноферментный анализ. Использование твердой фазы позволяет упростить процесс разделения компонентов реакции за счет иммобилизации одного из компонентов на твердой фазе и удаления субстанций, не участвующих в реакции.



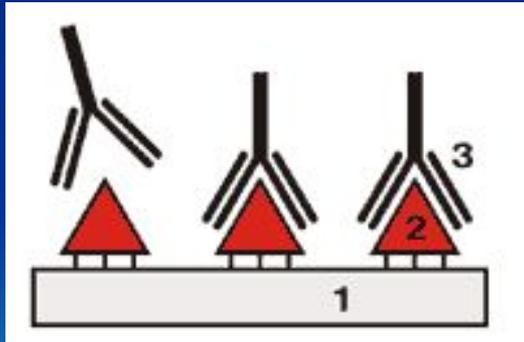
Иммуноферментный анализ

Для ферментативной метки конъюгата могут быть применены разнообразные ферменты: пероксидаза хрена, щелочная фосфотаза, бета-галактозидаза, глюкозооксидаза и др. Во всех коммерческих тест-системах используется пероксидаза хрена, выбор которой определяется ее высокой удельной каталитической активностью, доступностью, стабильностью, простотой детекции.

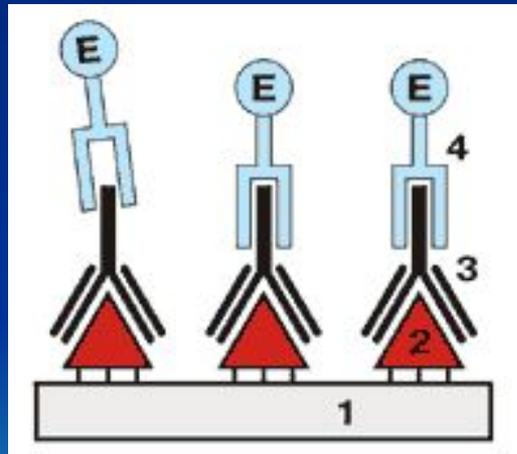


Иммуноферментный анализ

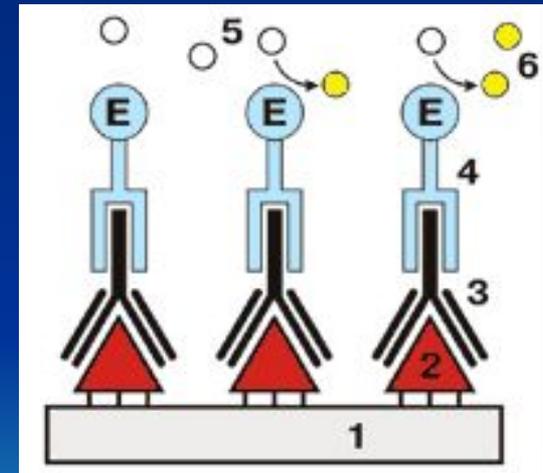
Этапы ИФА:



Взаимодействие
аналита с лигандом



Формирование
меченного комплекса

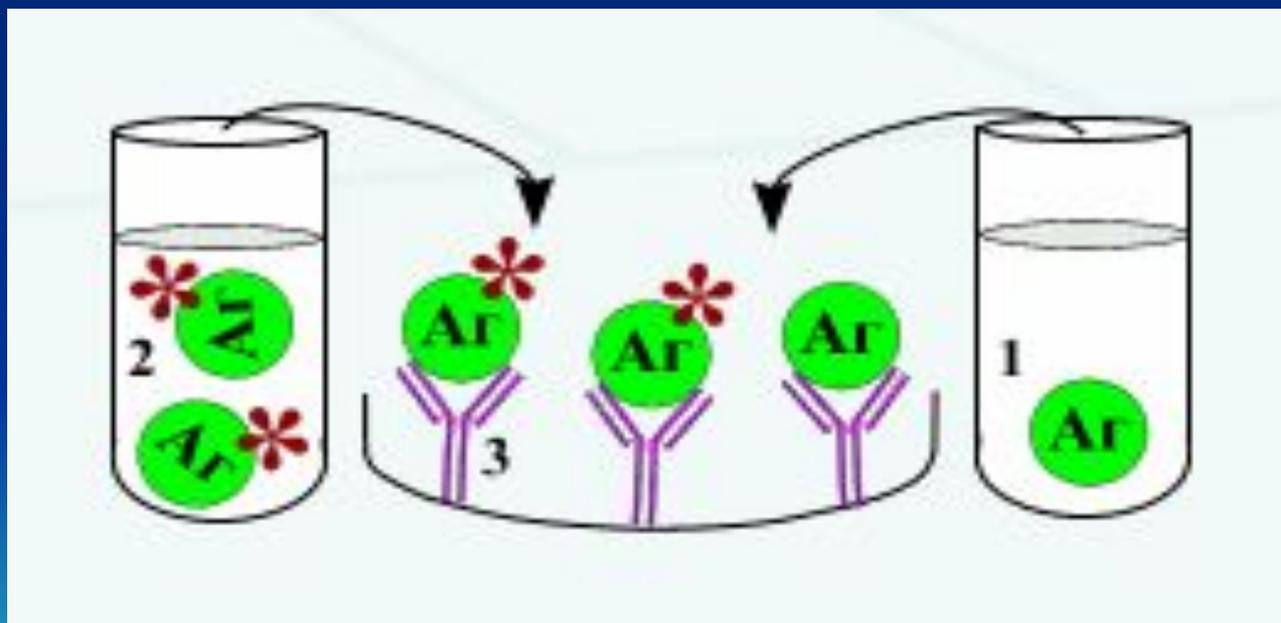


Измерение сигнала

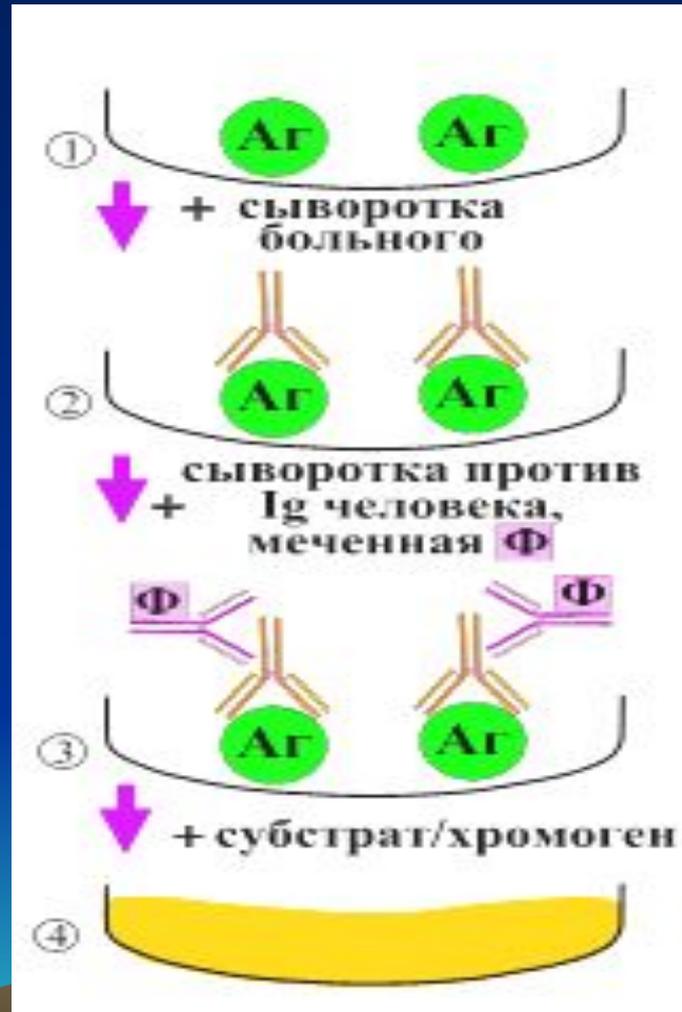


Конкурентный ИФА для определения антигенов

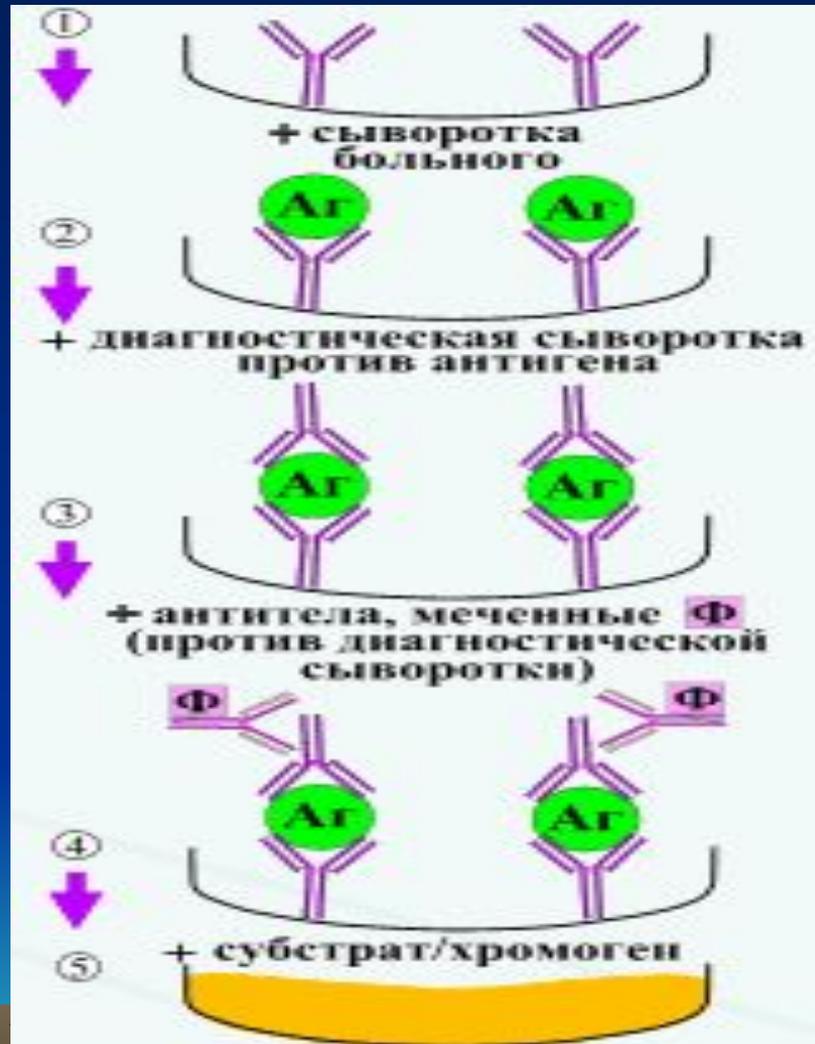
Искомый антиген(1) и меченый ферментом антиген(2) конкурируют друг с другом за антитела (3), сорбированные на твердой фазе.



- **Определение АГ в сыворотке больного (в лунках планшеток с сорбированным АГ (прямой ИФА))**



Определение АГ в сыворотке больного (в лунках планшеток с сорбированными АТ) прямой ИФА



Иммуноферментный анализ- это:

- Чувствительность, позволяющая выявлять концентрации до 0,05нг/мл;
- Возможность использовать минимальные объемы исследуемого материала;
- Стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более);
- Простота проведения реакции;
- Наличие как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета;
- Возможность автоматизации всех этапов реакции;
- Относительно низкая стоимость диагностических наборов.



Иммунохемилюминесцентный метод



Иммунохемилюминесцентный метод

- Аналитическая чувствительность - (ТТГ третьей генерации - 0,002 IU/ml. ПСА третьей генерации - 0,003 ng/ml.);
- Производительность - до 120 тестов в час;
- Автоматическое разведение для некоторых тестов;
- Количество реагентов, одновременно находящихся на борту - 12;
- Время выполнения исследования - 42 (72) минуты в зависимости от вида теста.



Иммунохемилюминесцентный метод

Смешивание и инкубация

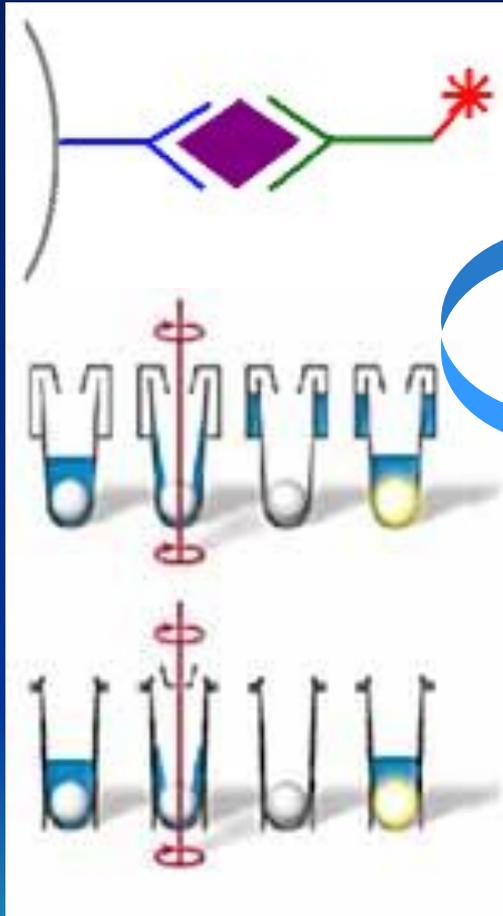
В состав входят пробирки со специальными шариками, покрытыми антителами или антигеном, которые используются в качестве твердой фазы реакции. Проба автоматически вносится в пробирку, содержащую шарик. Добавляется конъюгат, меченный ферментом щелочной фосфатазой.

Промывка

Для удаления неспецифических компонентов реакции используется уникальная система автоматической промывки.

Детекция

Добавление хемилюминесцентного субстрата, который взаимодействуя с щелочной фосфатазой выделяет кванты света.



Электрохемилюминесцентный метод



Электрохемилюминесцентный метод

Метод основан на детекции эмиссии света, возникшей под воздействием электрического поля.

Метка - рутениевый комплекс, чрезвычайно стабильная водорастворимая соль.

Рутениевый комплекс способен излучать свет на поверхности электрода при подаче на него напряжения (свечение достигает максимума за доли секунды).



Электрохемилюминесцентный метод

- 1-я инкубация. Проба + биотинилированное МА + второе МА, помеченное рутениевым комплектом реагируют с образованием "сэндвич"-комплекса.
- 2-я инкубация. Добавление микрочастиц, покрытых стрептавидином, связывание комплекса на твердой фазе за счет взаимодействия между биотином и стрептавидином.
- Реакционная смесь подается в измерительную кювету, где микрочастицы притягиваются магнитом на поверхность электрода. Несвязанные вещества затем удаляются с помощью буфера. После этого подача напряжения на электрод индуцирует хемилюминесцентное излучение, которое измеряется фотоумножителем.



Электрохемилюминесцентный метод

- **Высокая стабильность рутениевой метки (ферменты не используются, что значительно повышает стабильность реакции);**
- **Быстрота и надежность возникновения светового сигнала;**
- **Высокая -аналитическая чувствительность;**
- **В качестве твердой фазы используются мельчайшие (2,8 мкм), покрытые степовидином магнитные частицы. Частицы находятся в виде суспензии, обеспечивая большую поверхность для иммобилизации иммунных комплексов, что значительно ускоряет реакцию.**



Электрохемилюминесцентный метод

- Короткое время инкубации. (9-18 минут).
- Аналитическая чувствительность- (ТТГ - 0,005 IU/ml., ПСА - 0,005 ng/ml.);
- Широкий диапазон измерения;
- Производительность прибора до 90 анализов в час;
- Возможность параллельного тестирования - до 15 тестов одновременно;
- Автоматическое разведение.



Сопоставление методов применительно к гормональным исследованиям

Метод детекции	Чувствительность (моль/л)	Преимущества метода	Недостатки метода
Турбидиметрия, Нефелометрия (ИДЦ)	~ 10 ⁻⁶	Возможность проведения анализа в б/х пробе	Узкий спектр показателей
ИФА плащечная технология (ИДЦ)	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁶	«Открытость» системы	Концентрация ряда гормонов ниже чувствительности системы
ИФА пробирочная технология (ИДЦ)	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁶	Возможность быстрого получения результата (1 анализ)	Ограничен спектр, закрытая система
Флюоресценция (ИДЦ)	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁸	Возможность быстрого получения результата (1 анализ)	Эффект гашения флюоресценции, закрытые технологии
Флюоресценция с генерацией сигнала (ИДЦ)	10 ⁻¹⁶ - 10 ⁻⁹	Позволяет проводить измерения в широком диапазоне концентраций	Закрытые технологии, ограничен спектр показателей
Люминесценция (ИДЦ)	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁸	Позволяет проводить измерения в широком диапазоне концентраций	Закрытые технологии, ограничен спектр показателей
Люминесценция с генерацией света (ИДЦ)	10 ⁻¹⁶ - 10 ⁻¹⁰	Измерения в широком диапазоне концентраций, включая	Закрытые технологии, ограничен спектр



Группы методов лабораторной диагностики

□ Прямые

выявляют инфекционный агент

□ Непрямые (косвенные)

выявляют ответ организма на инфекционный агент



Непрямые методы

□ Все серологические реакции – РСК, РТГА, РПГА, ИФА и т.д.

□ Несомненные плюсы

- ответ появится независимо от места локализации процесса
- дают представления об ответе организма на ПБА
- можно определить стадию заболевания

□ Минусы

- подходят только для инфекционных заболеваний
- наличие «серологического окна»
- малая информативность в случае иммунодефицита
- целый ряд инфекций встречается и у здоровых пациентов



Прямые методы

- Микроскопия
- ИФА на антигены
- ПЦР
- Культуральный метод

Особенности прямых методов

- Врач должен знать стадии течения и представлять, где в какую стадию инфекционный агент может быть.
- Важно грамотное взятие материала.
- Надо помнить, что понятия «ИНФИЦИРОВАННОСТЬ» и «ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС» - не тождественны.
- Отрицательный результат при некорректном методическом подходе не исключает факта заболевания.



Выбор среди прямых методов лаб.диагностики

Световая микроскопия

Ряд микроорганизмов не визуализируется;
Схожесть морфотипов;
Субъективность оценки;
Высокая скорость проведения анализа.

Бак.посев

Трудности транспортировки и хранения материала до исследования;
Ряд микроорганизмов трудно или невозможно культивировать;
В процессе роста теряется соотношение;
Есть чувствительность к а/б;
Низкая скорость.

ПЦР

Скрининг – ДА или НЕТ;
Количественная оценка;
Динамические наблюдения;
Нет чувствительности к а/б;
Высокая скорость.

ИФА

Доступность для лаборатории;
Быстрота получения результата;
Качественная или количественная оценка;
Динамическое наблюдение при количественном определении.



Тем не менее:

- Ни один метод не является абсолютом, исключаящим все остальные
- Лучше всего комбинировать прямые методы с косвенными
- Результаты лаборатории врач должен сопоставлять с клинической картиной



Хроматографические методы исследования

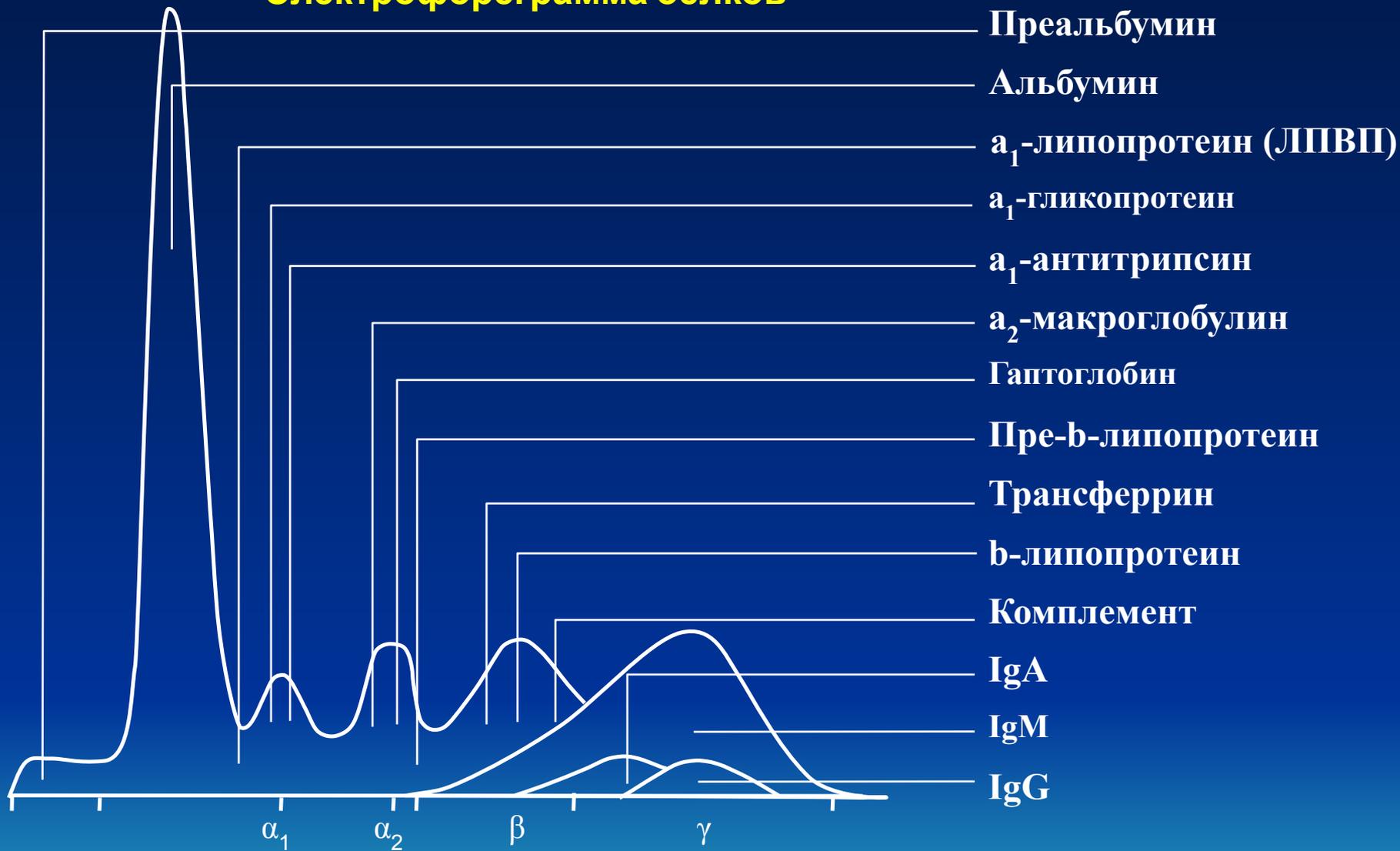
- Аффинная ЖХВД; Тонкослойная хроматография
Техника ТСХ. Приготовление пластинок. Нанесение
препаратов. «Проявление» пластинок, обнаружение
пятен или полос (денситометрия).
- Метод трудоемкий, токсичный.



Paragon-Appraise



Электрофореграмма белков





Система капиллярного электрофореза CAPILLARYS 2 (SEBIA)»

Инновационная технология разделения и анализа белковых фракций сыворотки крови, мочи

Производитель: SEBIA
ELECTROPHORESIS (Франция)



Система капиллярного электрофореза V8 – восьмиканальная автоматизированная система капиллярного электрофореза для разделения и анализа белков, цельной крови, сыворотки и мочи.
Производитель: HELENA BIOSCIENCES (Великобритания)

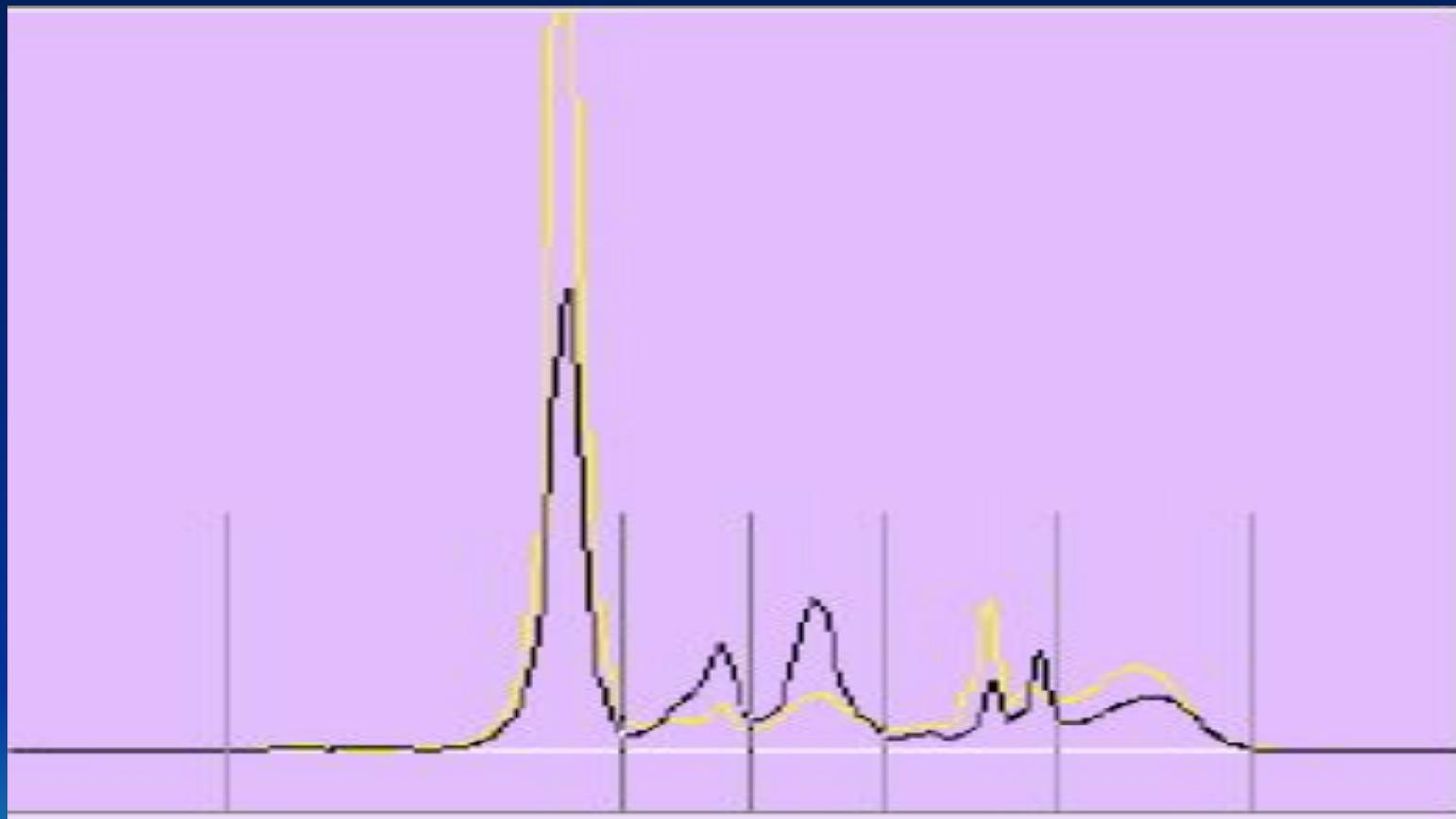


Система клинического капиллярного электрофореза PARAGON CZE® 2000 для разделения и анализа белковых фракций сыворотки крови, мочи и спинномозговой жидкости
Производитель: "Beckman-Coulter", (США)

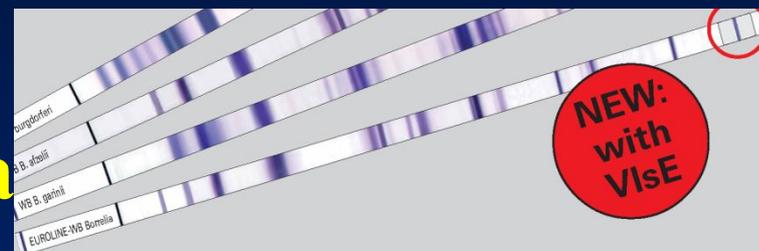
ИДЦ



Функция накладывания контрольной кривой



Экспресс-диагностика



- Иммуноблотинг;
- Диагностические наборы для клинической химии;
- Латекс-тесты для качественного и полуколичественного анализа;
- Иммунохроматографические тесты на картриджах и тест-полосках;
- Полоски для анализа мочи.



Преимущества экспресс-методов

- Анализ без доставки в КДЛ;
- Получения результатов через 2-20 мин.;
- Отсутствие дорогостоящих приборов при качественном и полуколичественном анализе;
- Использование простых приборов-ридеров для количественных исследований;

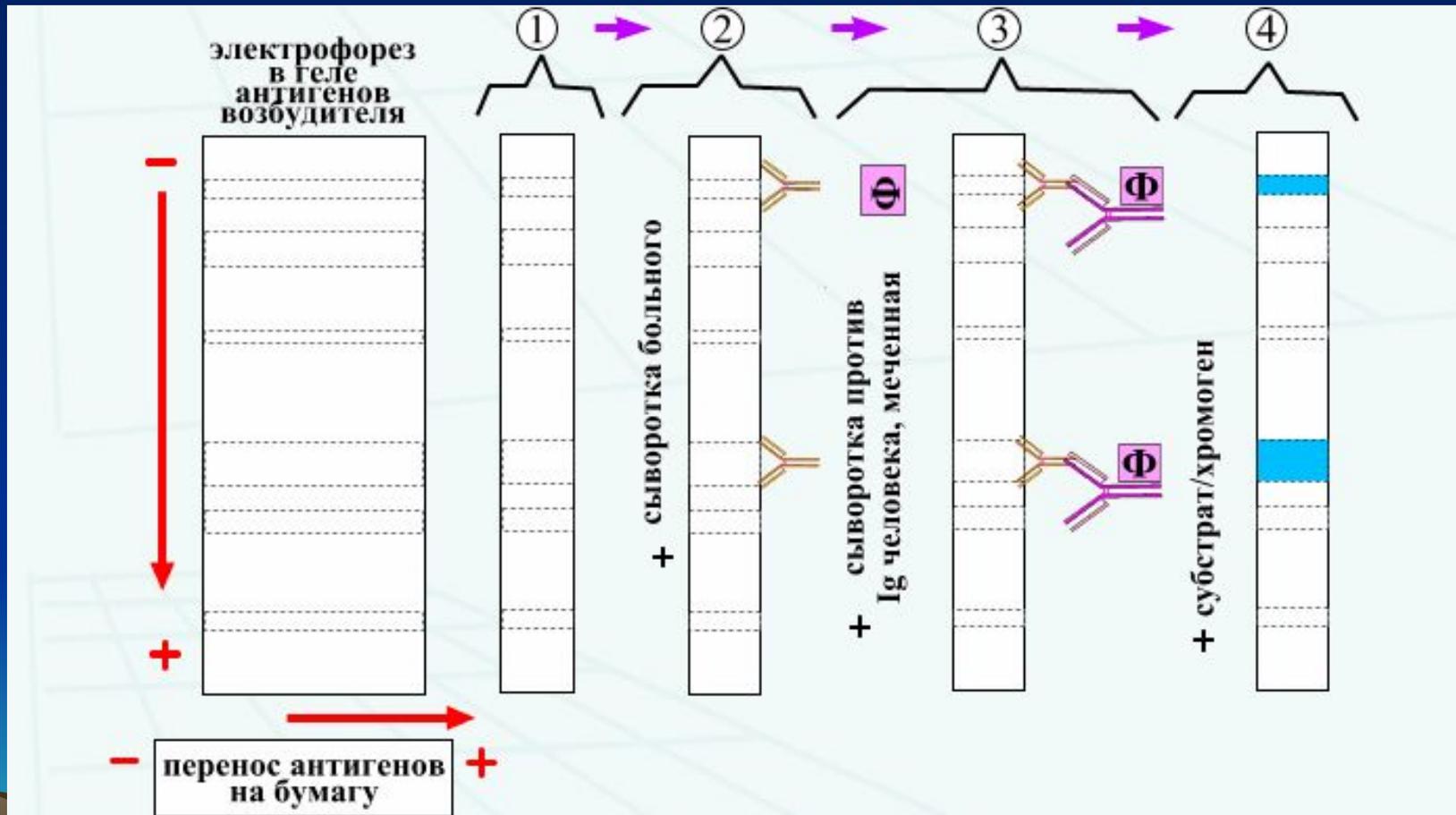


Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг (син. вестернблоттинг) - высокочувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА.

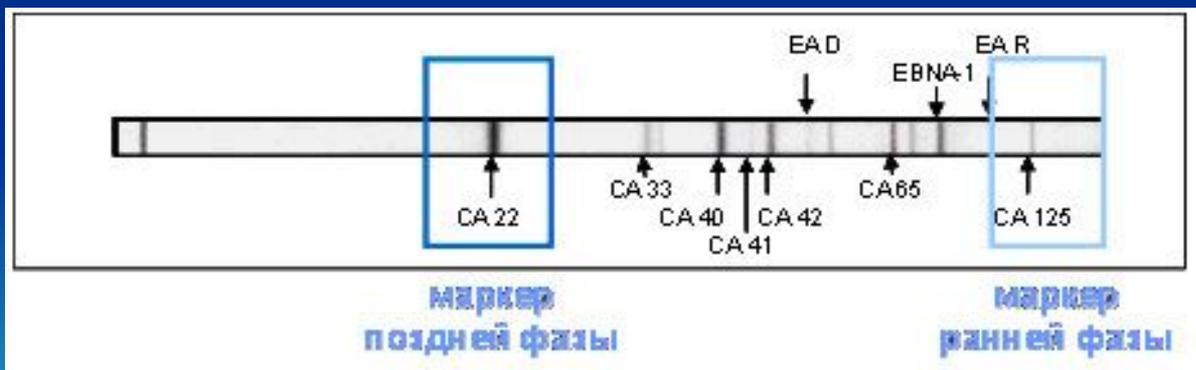
Метод выявления антител к отдельным антигенам возбудителя основан на постановке ИФА на нитроцеллюлозных мембранах, на которые в виде отдельных полос нанесены специфические белки, разделенные гель-электрофорезом. Если имеются антитела против определенных антигенов - появляется темная линия в соответствующем локусе стрипа.

Иммуноблоттинг



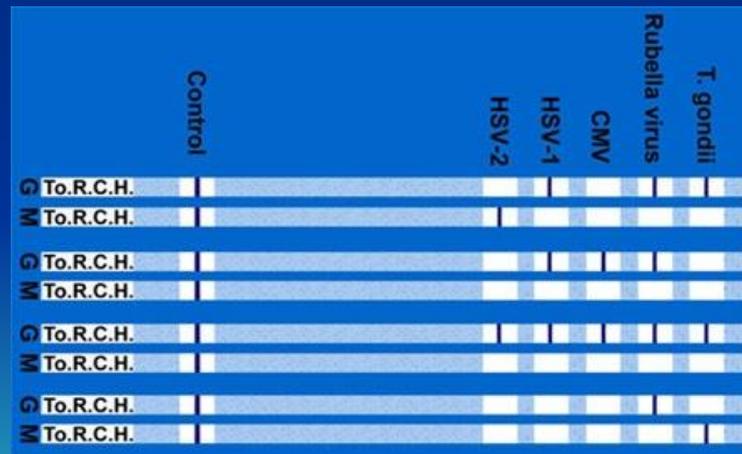
Иммуноблоттинг: виды наборов

Вестерн-блот: Наборы содержат тестовые стрипы-мембраны с электрофоретически разделенными нативными антигенами соответствующих инфекционных агентов, т.о. антигены располагаются в порядке молекулярной массы



Иммуноблоттинг: виды наборов

Лайн-блот: на тестовые стрип-мембраны нанесены только клинически значимые антигены (нативные, синтетические или рекомбинантные) в определенном порядке. Такой подход используется при дифференциальной диагностике нескольких инфекций на одном стрипе



Иммуноблоттинг: виды наборов

Southern Blot - разделение ДНК

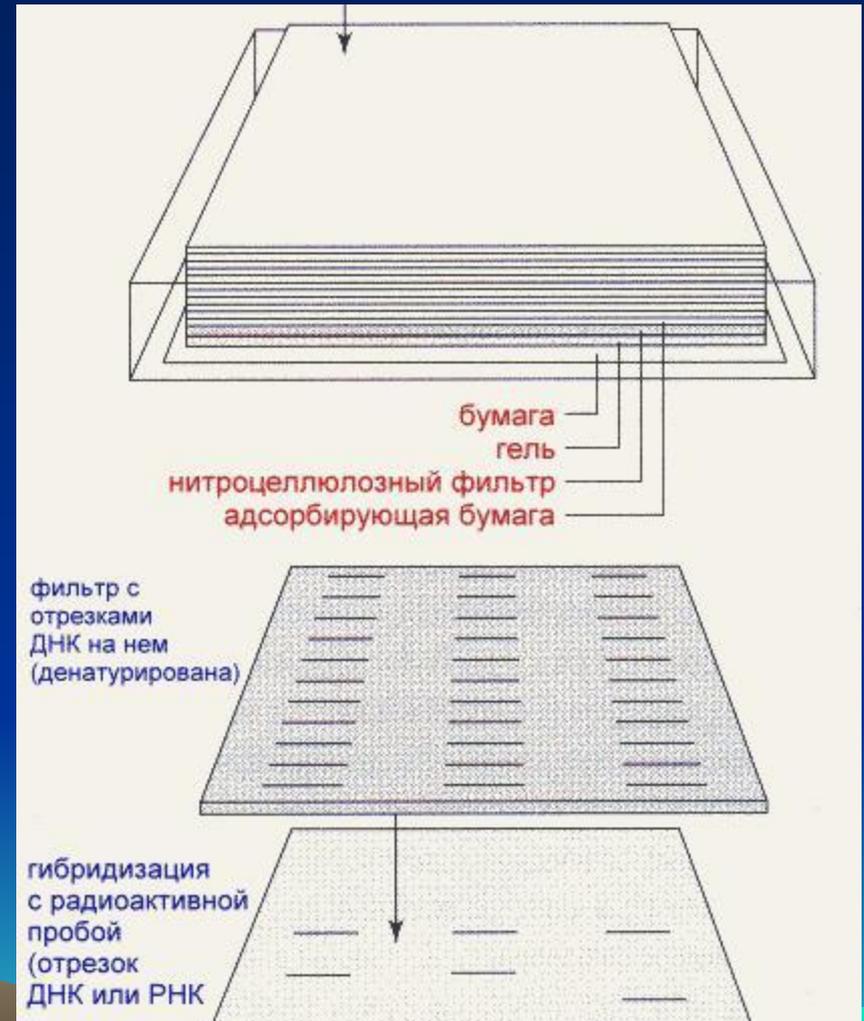
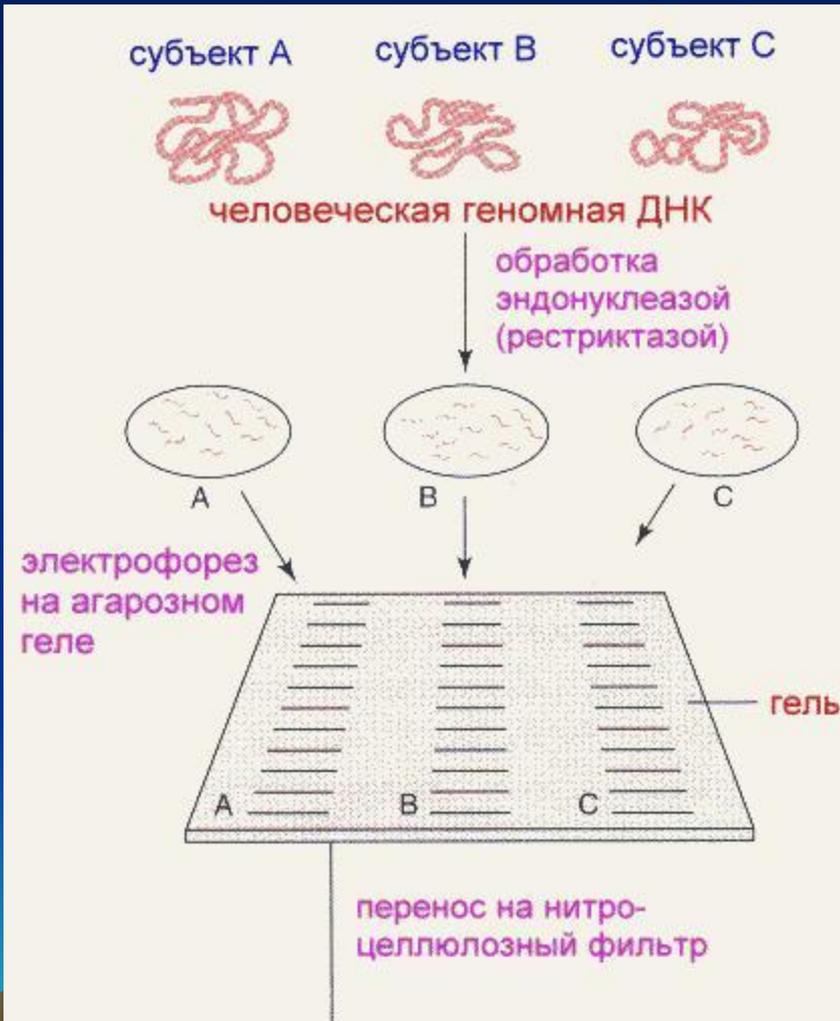
Northern Blot - разделение РНК

Western Blot - разделение белков

SOUTHERN BLOT - Процедура была разработана Е. М. Southern и в основе ее лежит перенос отрезков ДНК с поверхности геля ПААГ после разделения электрофорезом на нитроцеллюлозный фильтр под воздействием потока солевого элюента, вызываемого его впитыванием в слои фильтровальной бумаги.



SOUTHERN, WESTERN, NORTHERN BLOTS



SOUTHERN, WESTERN, NORTHERN BLOTS

На практике это используется для сравнения геномов отдельных лиц с целью выявления патологических изменений в последовательности нуклеотидов или установлении родственных отношений. Патологическая замена ряда нуклеотидов в зоне рестрикции приводит к ее исчезновению и смещению полосы относительно полос пациентов в норме.



Бесприборные тест-системы ИФА



IMMUNOCOMB ORGENICS

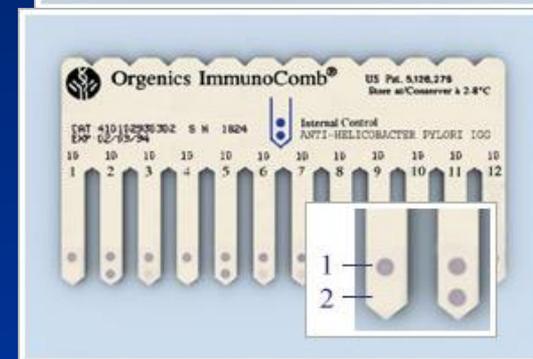
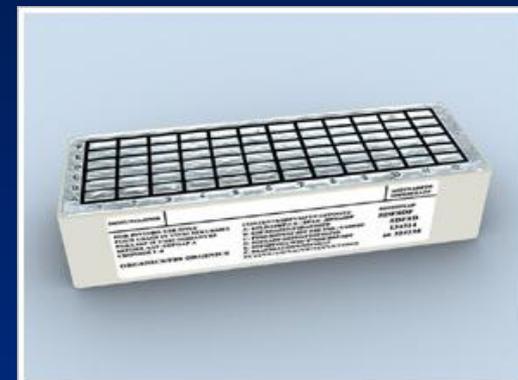
Оригинальная модификация твёрдофазного иммуноферментного анализа на гребенках, реализованная в наборах Иммунокомб, не требует использования дополнительного оборудования и растворов (набор полностью укомплектован и готов к использованию).

В качестве исследуемого материала применяется сыворотка или плазма крови, в исключительных случаях - цельная кровь. Один набор Иммунокомб рассчитан на 36 определений. Результаты можно получить через 40



IMMUNOCOMB ORGENICS

Зубцы пластикового гребня
сенсibiliзирoваны
соответствующими антигенами
или антителами. Ячейки
ванночек заполнены готовыми
растворами конъюгата,
промывочными буферами и
красителем



Учёт результатов – визуальный
(с помощью CombScale)
или полностью
автоматизированный на
приборе CombScan.



IMMUNOCOMB ORGENICS



При необходимости гребешок можно согнуть и отломить зубцы для индивидуального тестирования

3

Введите гребешок в ряд В, инкубируйте.



1

Внесите образцы и контроли в ряд А

4

Цветная реакция в ряду F

ВСЛЕД ЗА ИНКУБАЦИЕЙ В РЯДАХ С, Д И Е:



2

Вставьте гребешок в ряд А, инкубируйте.

5

Считывание результатов. Гребешок можно хранить длительное время вместе с историей болезни в качестве документального подтверждения результатов теста.



Латекс-тесты

- Скрининг-тесты для диагностики ревматоидных заболеваний;
- Для выявления инфекционных заболеваний (кандидоз, инфекционный мононуклеоз, токсоплазмоз, сифилис);
- Фертильность и бесплодие (ХГч, анти-овариальные АТ, антиспермальные АТ);



Реакция агглютинации

Ревматоидный фактор «RF Direct Latex»

Изготовитель - VEDA.LAB – Франция

РФ латекс-реагент – является суспензией полистироловых частиц, сенсibilизированных гамма-глобулином. При смешивании реагента с образцом сыворотки, содержащим ревматоидный фактор, происходит реакция агглютинации, которая легко регистрируется визуально. Наличие или отсутствие видимой агглютинации указывает на наличие или отсутствие РФ в тестируемом образце.

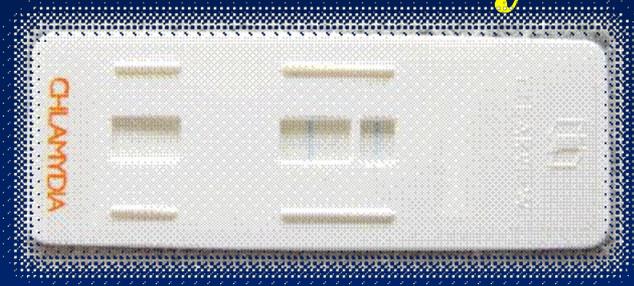


Иммунохроматографические тесты

- Диагностика гепатитов, половых инфекций, гриппа А и Б, инфекций ЖКТ, туберкулеза, малярии, прочих инфекций, в том числе и torch-инфекций.
- Скрининг врожденного гипотиреоза (неонатальный ТТГ), выявление гормональной дисфункции щитовидной железы (ТТГ), проблемы беременности (ХГч, ЛГ, ФСГ), диагностика патологии сосудов (миоглобин, Д-димер, сердечный тропонин и т.д.).
- Онкомаркеры (ПСА, АФП, скрытая кровь в фекалиях и т.д.).
- Наркотический контроль (Барбитураты, марихуана, Экстази, опиаты и т.д.)



Иммунохроматография



В реакции используют антитела к искомому антигену, адсорбированные на микрочастицах (окрашенный латекс или частицы коллоидного золота), и антитела к тому же антигену, иммобилизованные в виде полосы на хроматографической бумаге. Кроме того, в этой реакции имеется внутренний контроль (антивидовые антитела, также закрепленные в виде полосы на хроматографической бумаге).



Принцип действия иммуно-хроматографического планшета

Антиген

Полоска хроматографической бумаги

Антитела, адсорбированные на окрашенных частицах

Зона внутреннего контроля

Антивидовые антитела, адсорбированные на хроматографической полоске

Антитела, адсорбированные на хроматографической полоске

Зона нанесения пробы

Зона учета результата теста



Тест-полоски для анализа мочи



- Диагностика декомпенсированной стадии СД, сопровождающегося кетоацидозом и осложненные ренопатией;
- Диагностика нефрологических заболеваний;
- Длительность анализа 5-10 мин., высокая чувств. и спец., встроенный контроль качества, возможность тестировать различные типы биологических жидкостей.

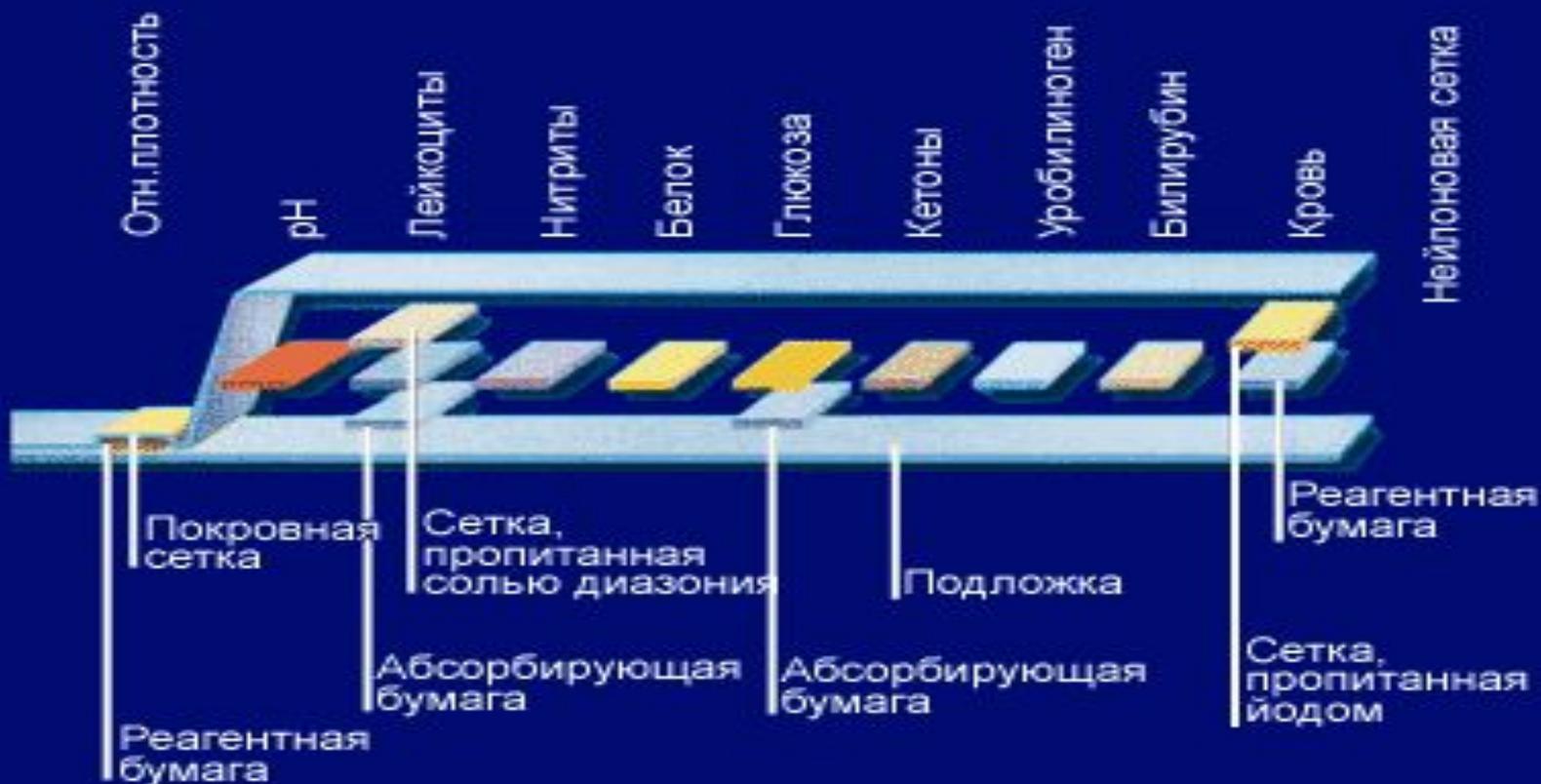


Тест-полоски для анализа мочи

Тестовые поля представляют собой бумагу, пропитанную стандартным количеством необходимых для реакции компонентов, которые предварительно были стабилизированы с помощью высушивания. Компоненты эти могут быть индикаторами, ферментами или другими добавочными реагентами. При взаимодействии с исследуемой биологической жидкостью реагенты растворяются и вступают в реакцию, которая проявляется окраской различной интенсивности и пропорциональна концентрации исследуемого параметра.



Принципиальная схема полоски для анализа мочи



Тестовое поле на гемоглобин в поперечном сечении



Полоски для анализа мочи контролируют:

- 1. нарушение углеводного обмена: глюкоза кетоновые тела
- 2. заболевания печени и желчевыводящих путей и гемолитические состояния : уробилиноген, билирубин
- 3. патологию почек и урогенитального тракта: относительная плотность, рН, нитриты, белок, лейкоциты, .кровь (эритроциты и гемоглобин)



Возможно применение видеоцифровых комплексов на базе сканеров EPSON для регистрации анализов с использованием специальных программ.

- **Возможности программ:**
- **Получение первичного изображения всех тестов;**
- **Контрастирование и увеличение изображения;**
- **Сопоставление изображений образцов с контролем;**
- **Определение порога для дискриминации положительных и отрицательных образцов;**
- **Получение объективных цифровых значений, характеризующих интенсивность реакции и визуальное представление результатов.**



Возможно применение видеоцифровых комплексов на базе сканеров EPSON для регистрации анализов с использованием специальных программ.

- **Возможности программ:**
- **Получение первичного изображения всех тестов;**
- **Контрастирование и увеличение изображения;**
- **Сопоставление изображений образцов с контролем;**
- **Определение порога для дискриминации положительных и отрицательных образцов;**
- **Получение объективных цифровых значений, характеризующих интенсивность реакции и визуальное представление результатов.**



Thank you for your attention!

