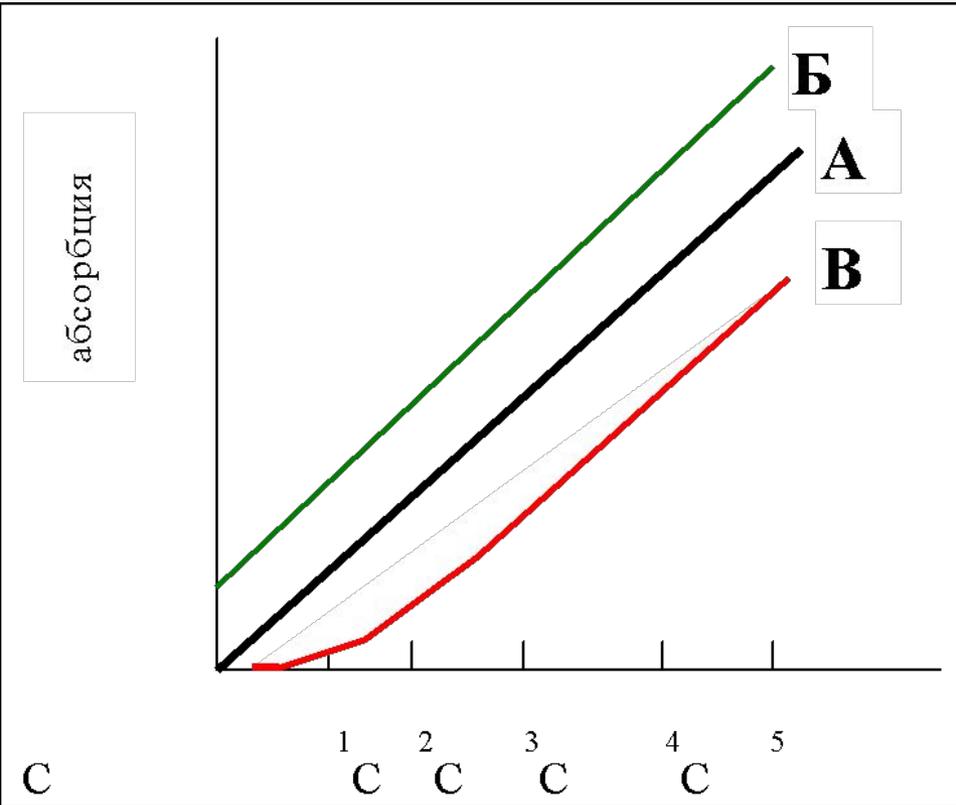


Фотометрические методы биохимического анализа

ИЗМЕРЕНИЕ ПО КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ



варианта при построении калибровочного графика при линейной зависимости экстинкции от концентрации исследуемого вещества:

- А - закон Бугера-Ламберта-Бера, прямая выходит из нулевой точки, правильный вариант калибровочного графика
- Б - имеет место влияние систематического фактора, желательно измерение по сравнению с холостой пробой, в которой бы этот фактор учитывался.
- В - измерение неверное, низкие концентрации вещества не измеряются

Методы сравнения стандартного и опытного образца

- Анализируемая и стандартная проба обрабатываются в одинаковых условиях
- При больших сериях – стандартную пробу исследовать в начале серии и через каждые 20 проб
- Расчет ведут по стандарту или по фактору
- Расчет по стандарту: $C_i = D_i \times C_{ст}/D_{ст}$
- Расчет по фактору: $C = D \times F$

Методы определения без использования калибратора

- Фотометрические единицы (в случае отсутствия калибратора – средние молекулы, серомукоид) – оптическую плотность умножают на 100
- ($D = 0,3$, ответ – 30 единиц)

Методы определения без использования калибратора

- Определение концентрации по молярному показателю поглощения – применение закона Бургера

$C = D/lx\xi$ (концентрация определяется делением измеренной оптической плотности на известный для данного вещества молярный показатель поглощения при длине волны измерения: $C = D/\xi$)

Учитывать разведение образца

Спектральные характеристики хромогенов

Максимум поглощения в воде, $\lambda_{\text{макс}}$, нм	Молярный показатель поглощения, ϵ , (л/моль · см)	Субстрат	Хромоген	Применение в клинической химии
340	6220	НАД ⁺ , НАДФ ⁺	НАД·Н, НАДФ·Н	Оптический тест Варбурга
400	18300	p-нитро-фенил-фосфат	p-нитрофенол	Определение активности фосфомоноэстераз. При 400 нм поглощает субстрат, поэтому измерение проводят при 405 нм
420	21300	o-нитро-фенил- β -D-галактопиранозид	o-нитрофенол	Определение активности β -галактозидазы (лактазы), определение концентрации натрия энзиматическим методом
550	26600	фенолфталеин- β -D-глюкуро-нид	фенолфталеин	Определение активности β -глюкуронидазы
550			Комплекс Cu^{+2} с белком	Биуретовый метод определения белка
595			Комплекс белка с красителем Кумасси G250	Метод Брэдфорда определения белка в моче
600		тимолфталеинфосфат	тимолфталеин	Определение активности щелочной фосфатазы

Примеры:

- **Определение концентрации НАДН на основе определения оптической плотности**

Молярный показатель НАДН при 340 нм $6,22 \times 10^3$ л×моль⁻¹×см⁻¹. (ввести верхний символ). Измерена оптическая плотность в 1 см кювете – 0,38

Концентрация НАДН определяется по соотношению

$$C = \frac{D}{\epsilon l} = \frac{0,38}{6,22 \times 10^3 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \text{ см}^{-1} \times 1 \text{ см}} = \frac{0,38}{6,22 \times 10^3 \text{ л} \times \text{моль}^{-1}} = 6,11 \times 10^{-5} \text{ моль/л}$$

Определение содержания гемоглобина гемоглобинцианидным методом

Миллимолярный коэффициент при 540 нм = 11

Молекулярная масса гемоглобина – 64458, состоит из 4 съединицы

Эквивалентный вес Hb = 16114, т.е. 1 моль соответствует 16,114 Hb в крови

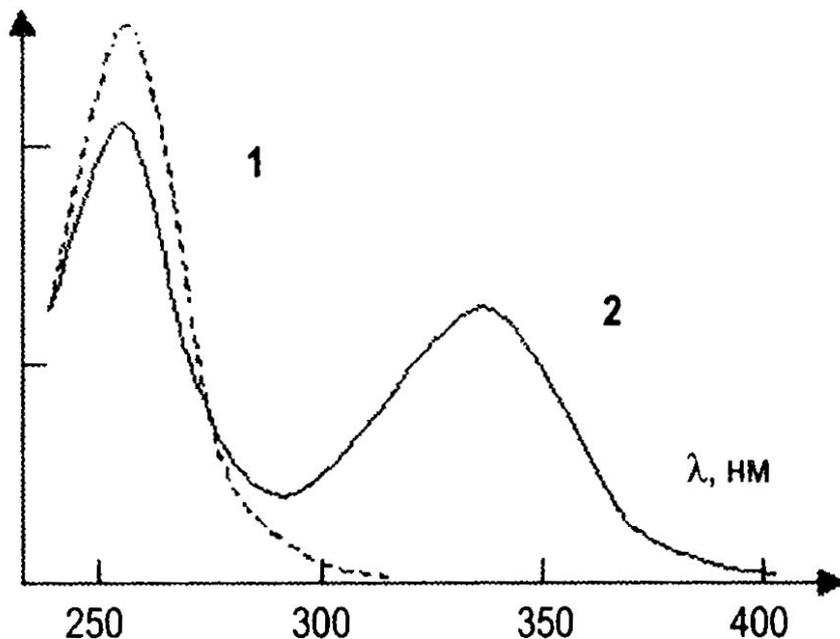
Кровь разводят трансформирующим раствором 1:251 (0,02 мл крови + 5,0 мл трансформирующего раствора)

$$\begin{aligned} \text{Hb в г/л} &= \\ &= \frac{\text{Оптическая плотность} \times \text{миллиэквивалентный вес} \times \text{разведение}}{\text{миллимолярный показатель поглощения} \times \text{толщина оптического слоя в см}} = \\ &= \frac{D \times 16,114 \times 251}{11,0 \times 1,0} = D \times 367,7 \end{aligned}$$

Измерение скорости изменения поглощения

- Фотометрические измерения проводят непосредственно при протекании реакции
 - *Потребление субстратов*
 - *Повышение концентрации продуктов*
 - *Изменение кофакторов (оптический тест Варбурга)*

НАДН и НАДФН имеют максимум поглощения при λ 340 нм

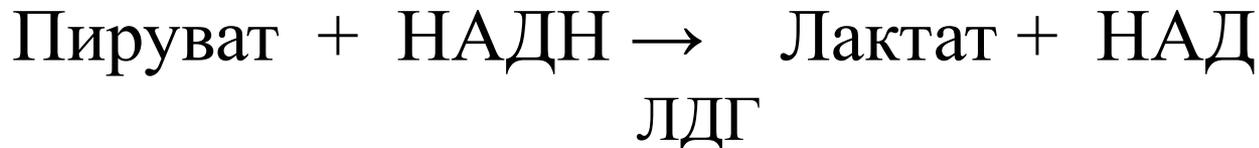


НАДН и НАДФН
имеют максимум
поглощения при λ
340 нм

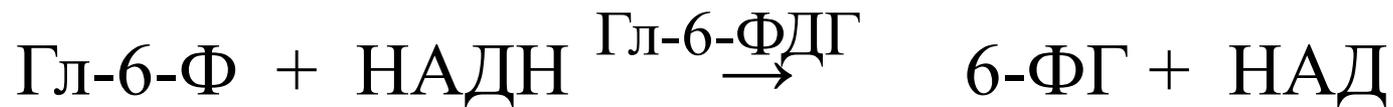
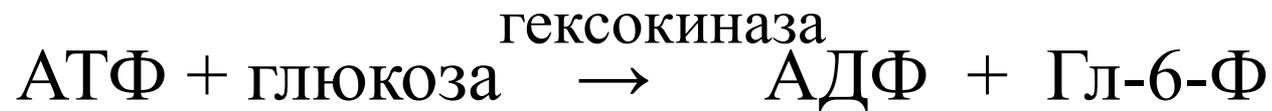
Тест можно использовать для определения скорости тех реакций, которые протекают с образованием продуктов, которые окисляются с участием НАД или окислением НАДН

Сопряженные реакции

АЛТ



КК



При кинетическом определении вычисляют изменение поглощения за 1 минуту

$$A = \frac{V \times 1000}{\epsilon \times l \times v} \times \frac{\Delta D}{\text{МИН}}$$

A – активность фермента (МЕ, Ед или U)- кол-во молекул фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин.

V – объем реакционной смеси

1000 – пересчет ммоль в мкмоль

ϵ – миллимолярный показатель поглощения НАДН (6,22 л/ммоль \times см)

l – длина оптического пути (1 см)

v – объем пробы, мл

ΔD – изменение оптической плотности за 1 мин

$\frac{V \times 1000}{\epsilon \times l \times v}$ Результат вычисления – фактор F

$$A = F \times \frac{\Delta D}{\text{МИН}}$$

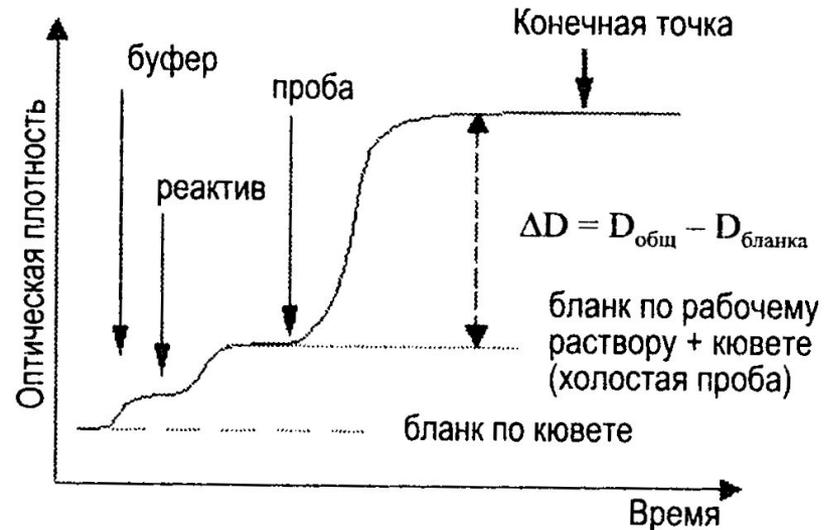
Единицы активности ферментов

- ***Катал*** – количество фермента, превращающего 1 моль субстрата за 1 сек
- ***МЕ*** - количество фермента, превращающего 1 мкмоль субстрата за 1 минуту

$\text{МЕ/л} \leftrightarrow 0,0167 \text{ мккат/л}$ или $\text{МЕ/л} \leftrightarrow 16,7 \text{ нкат/л}$

Измерение по конечной точке

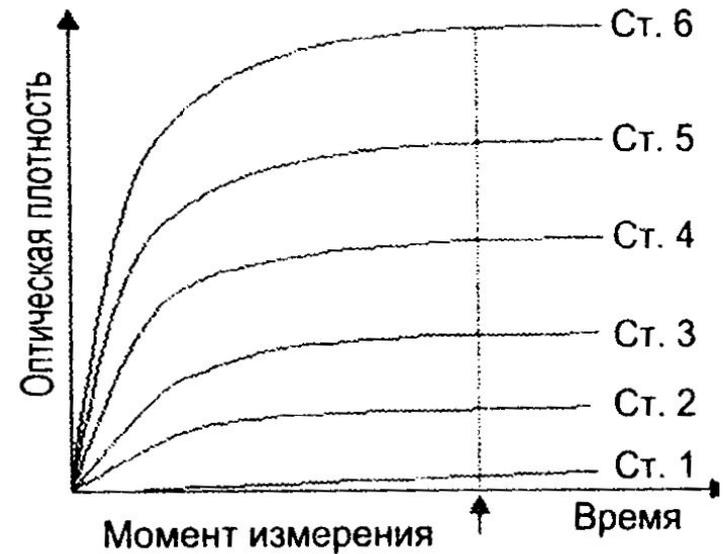
- Реакция развивается за некоторый период времени и достигает определенного конечного состояния (конечная точка)
- При измерении по конечной точке уровень сигнала соответствует количеству продуктов реакции в инкубационной среде после фиксированного времени инкубации
- Поглощение измеряется после окончания реакции при стабильном значении сигнала



Стрелки указаны моменты внесения буфера, реактива, биологической пробы

1-точечное измерение на двухлучевом фотометре

- Измерение ведется в режиме сравнения растворов в двух кюветах
- В каждую кювету вносится одинаковое количество реактива, в 1-ую – проба с известной концентрацией (стандартная), в другую – такое же кол-во воды (физ. р-ра) – бланк. Бланк автоматически вычитается



Сигнал развивается как функция времени для 6 стандартов. Исходная точка - нуль. Концентрация каждого стандарта измеряется 1 раз по конечной точке (по достижении стационарного уровня).

Измерение с бланком на однолучевом фотометре

- Для исключения систематического влияния (рабочий реактив, отражение от стенок кювет, темновой ток) используют измерение относительно холостой пробы (бланка)
- Бланк определяют по рабочему реактиву перед измерением пробы

$$D_{\text{пробы}} = D_{\text{конечной точки}} - D_{\text{бланка}}$$

Процедура сходна с одноточечным измерением, но учет бланка проводится в ручном режиме

Рабочая таблица для определения концентрации методом измерения с бланком по рабочему реактиву

	Бланк	Стандарт	Проба
Рабочий раствор	1 мл	1 мл	1 мл
Вода	10 мкл	-	-
Стандарт	-	10 мкл	-
Проба	-	-	10 мкл

Перемешать, измерить оптическую плотность через 5 мин инкубации, $t=37^{\circ}$, $\lambda = 540$ нм

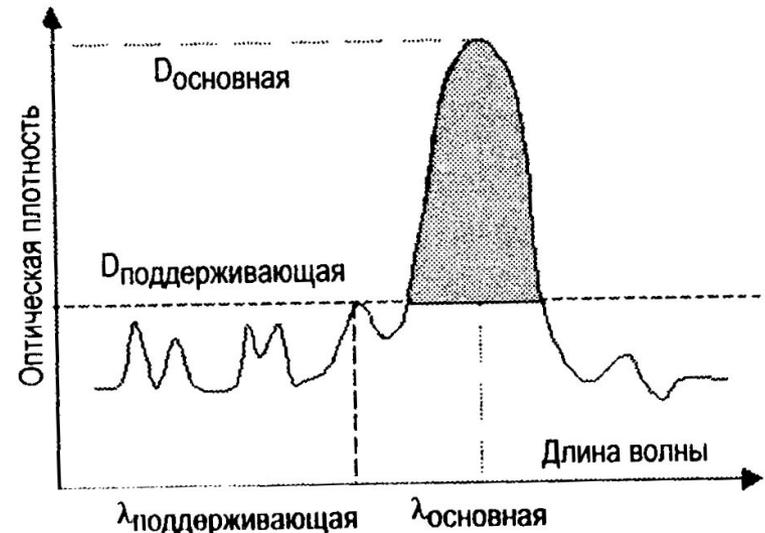
$$C_{\text{пробы}} = \frac{\Delta D_{\text{пробы}} - \Delta D_{\text{бланка}}}{\Delta D_{\text{стандарта}} - \Delta D_{\text{бланка}}} \times C_{\text{стандарта}}$$

Измерение с прозоной

- Разновидность измерения с бланком
- Измерение в одной кювете, отсутствует кювета сравнения
- Проводят определение до прибавления биопробы
- Характерен для биохимических анализаторов (*двухточечное измерение с прозоной*)
- Прозона – временной период до добавления в кювету пробы.
- При добавлении нескольких реактивов прозона определяется при достижении стабильного состояния после внесения всех реактивов перед пробой

Двухволновое измерение с опорной длиной волны

- Необходимо для исключения мешающих факторов (гемолиз, иктеричность, липемичность, использование исчерченных кювет)
- Измерение проводят на 2 длинах волн – основной и поддерживающей
- Измеряется только сигнал, связанный с аналитом
- Может применяться на приборах, у которых кювета облучается белым светом, а монохроматор расположен после кюветы
- Опорная волна не должна отступать от основной более, чем на 100 нм



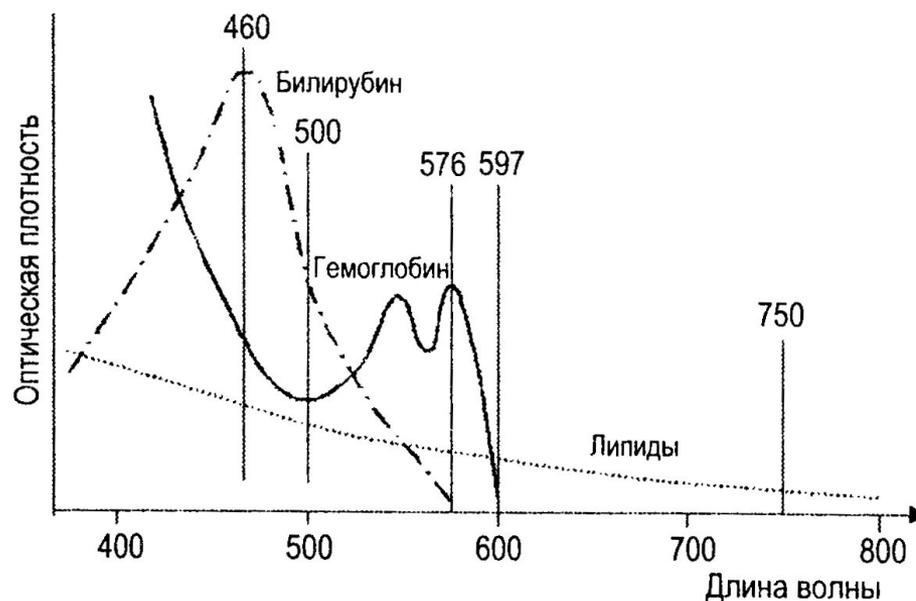
Поглощение, соответствующее влиянию интерферирующих факторов (поглощение на соседних длинах волн) отсекается. Учитывается только плотность выше $D_{\text{опорная}}$

Принцип получения информации о степени иктеричности, липемичности и гемолиза сыворотки

- 20 мкл сыворотки, смешать с 200 мкл дистиллированной воды, добавить 600 мкл 0,15 М фосфатный буфер (pH = 7,4)
- Раствор измеряется при длинах волн 460, 500, 576, 597, и 750 нм Вычисляются
 1. ΔD 460/500 (разность плотностей) (иктеричность)
 2. ΔD 576/597 (разность плотностей) (гемолитичность)
 3. ΔD 597/750 (разность плотностей) (липемичность)

**Таблица 11. Ранговые значения оптической плотности
и степени иктеричности, липимичности
и гемолиза сыворотки крови**

Ранговое значение	Иктеричность (DD 460/500)	Гемолитичность (DD 576/597)	Липимичность (DD 597/750)
0 (-)	< 0,040	< 0,002	< 0,006
1 (+)	0,040–0,103	0,002–0,005	0,006–0,011
2 (++)	0,104–0,204	0,006–0,009	0,012–0,020
3 (+++)	> 0,204	> 0,009	> 0,020



Кинетические измерения

- Определение меняющейся в ходе реакции оптической плотности
- Широко используется для определения активности ферментов
- Требует точного поддержания температуры в измерительной кювете ($\pm 0,1^{\circ}\text{C}$), правильного отсчета временных интервалов

Условия обязательны, доступны только при использовании современных фотометров и биохимических анализаторов

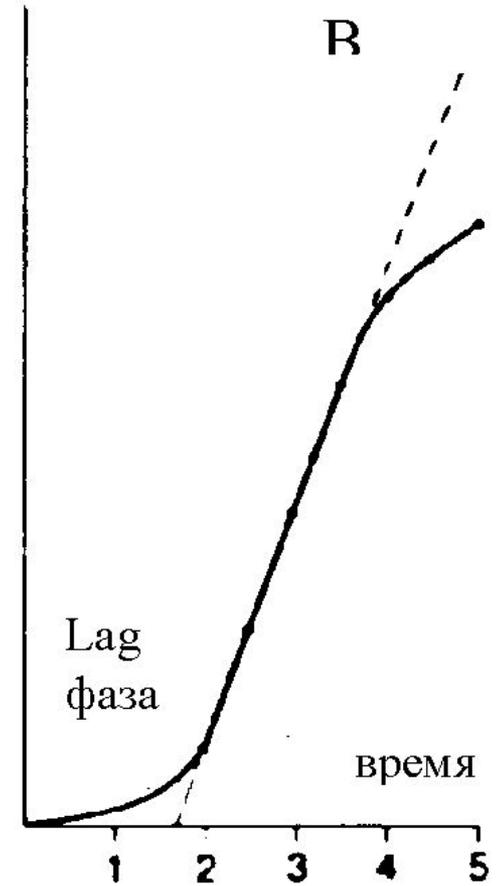
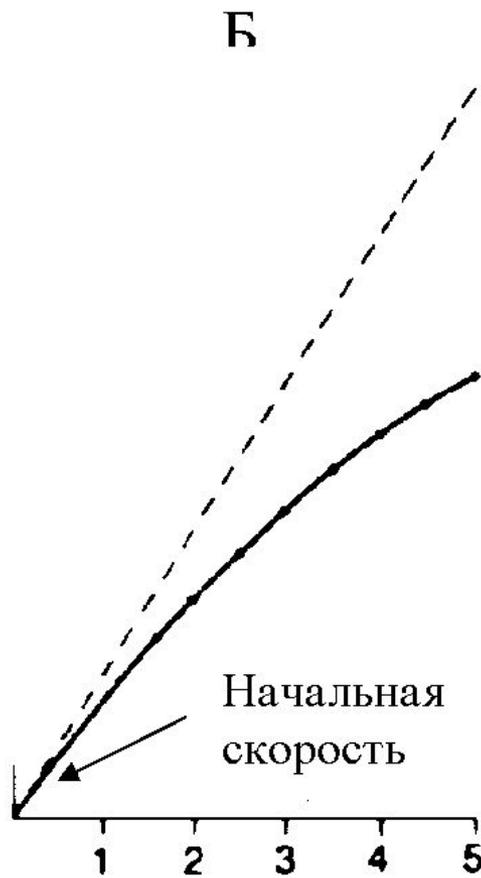
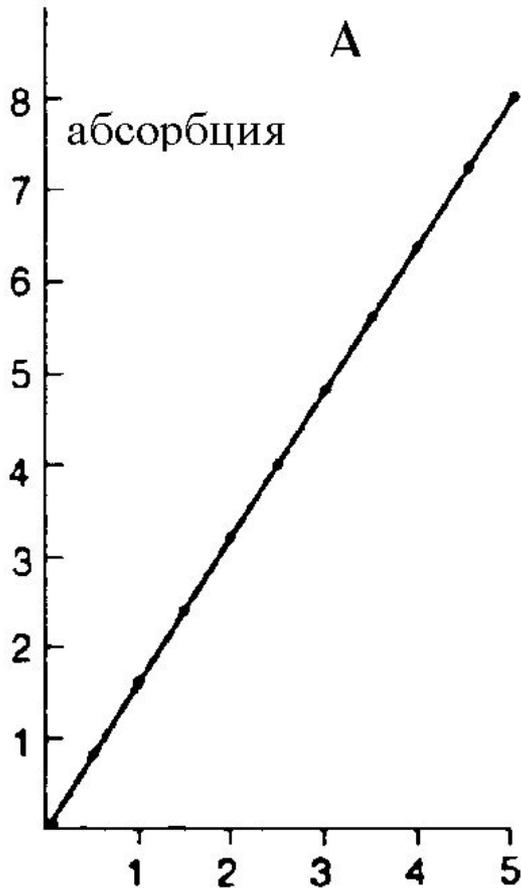
Корректирующие температурные коэффициенты для активности ферментов

Фермент	Температура в измерительной ячейке		
	25 °С	30 °С	37 °С
Аланинаминотрансфераза (АЛТ)	1,00	1,32	1,82
Аспартатаминотрансфераза (АСТ)	1,00	1,37	2,08
α -Амилаза	1,00	1,30	1,80
γ -Глутамилтрансфераза (ГГТ)	1,00	1,37	1,79
Креатинкиназа (КК)	1,00	1,56	2,44
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	1,00	1,33	1,92
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	1,00	1,22	1,64
Холинэстераза (ХЭ)	1,00	1,24	1,55

Коэффициенты имеют ориентировочный характер, т.к. зависят также от буфера, рН, ионной силы т.д.

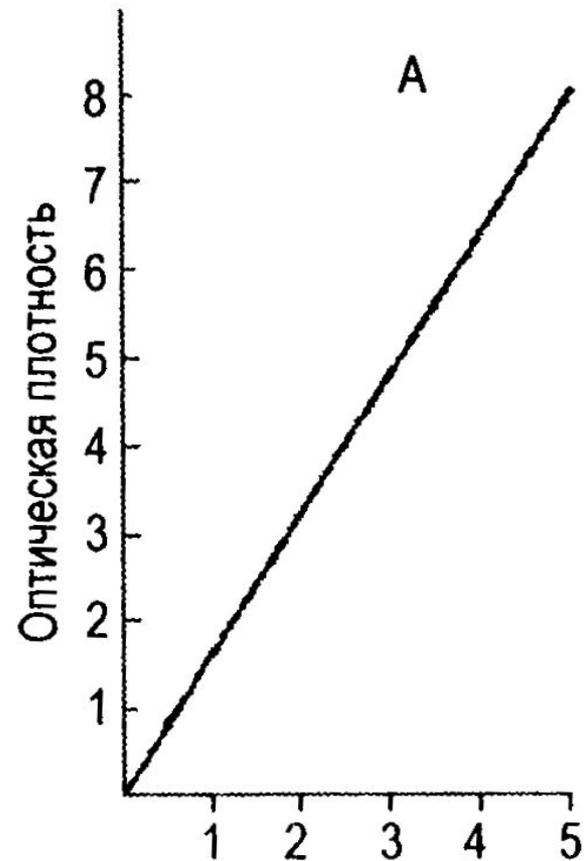
Измерение по кинетике

А - скорость постоянна, в любой период можно по скорости реакции оценивать активность фермента, Б - скорость реакции постоянно снижается, рекомендуется активность фермента оценивать по начальной скорости, В - линейный участок, на котором рекомендуется определять активность фермента, устанавливается в середине периода инкубации



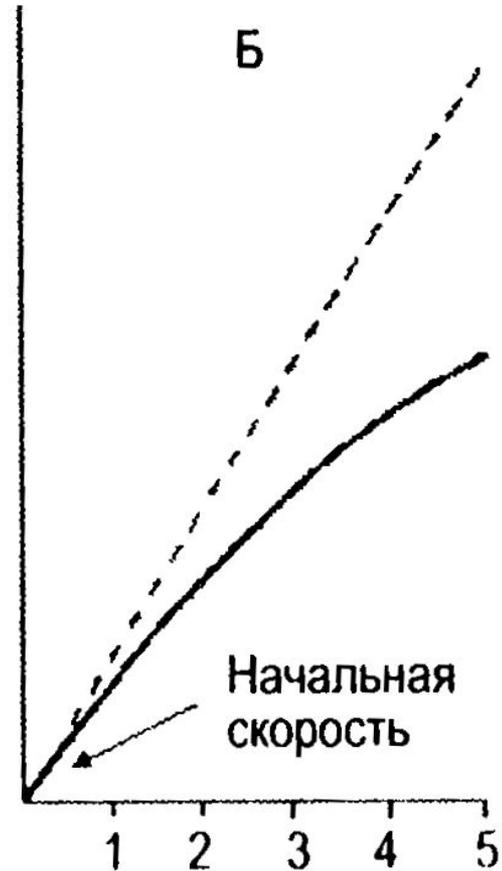
Измерение по двум точкам

- При постоянной скорости кинетической реакции измерение можно проводить на любом отрезке линейной кривой, приводя поглощение к 1 мин.
- Достоинства – простота, возможность измерения без стандарта, независимость в пределах линейного диапазона.
- Допустим при повторном использовании разовых кювет
- Следует убедиться что измерение проводится в линейном диапазоне



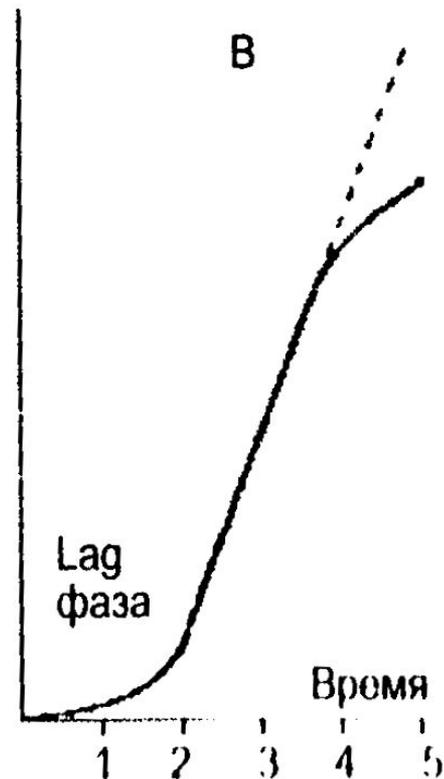
Измерение по двум точкам

- **Возможны методические ошибки**
- Если реакция начинается с очень высокой скоростью, то она может замедлиться или прекратиться из-за потребления всего субстрата.
- Несоответствие выявляется при сопоставлении клинических данных и биохимических исследований
- Реакция может иметь нелинейный характер



Измерение по двум точкам

- Реакция может задержаться на старте (Lag-фаза в мультиферментных системах)
- Обусловлена, по-видимому, задержкой образованием фермент-субстратного комплекса.
- Может продолжаться до нескольких минут
- Имеет значение порядок внесения реактивов – для лучшего перемешивания реактив большего объема добавлять к меньшему объему.
- В измерительную кювету вносится сначала проба, а затем рабочий реактив.

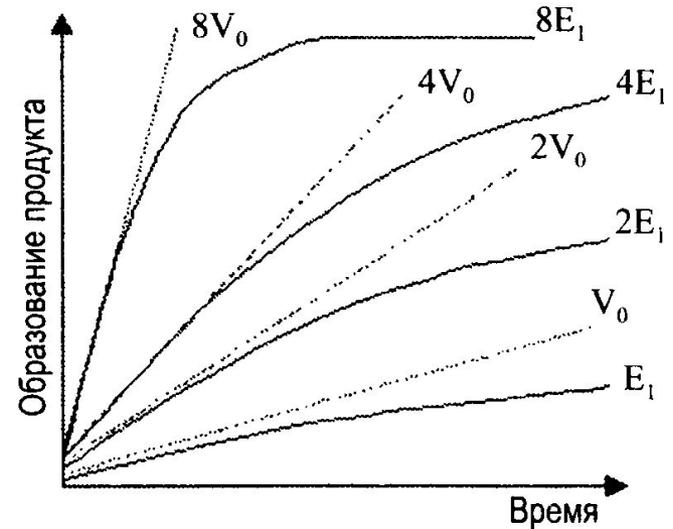


Многоточечное измерение

- Позволяет оценивать характер кинетики и выбирать для расчетов линейный участок
- Является наиболее точным методом определения активности ферментов
- Изменение оптического поглощения должно быть одинаковым за равные промежутки времени (отклонение от линейности не должно превышать 10%)

Многоточечное измерение

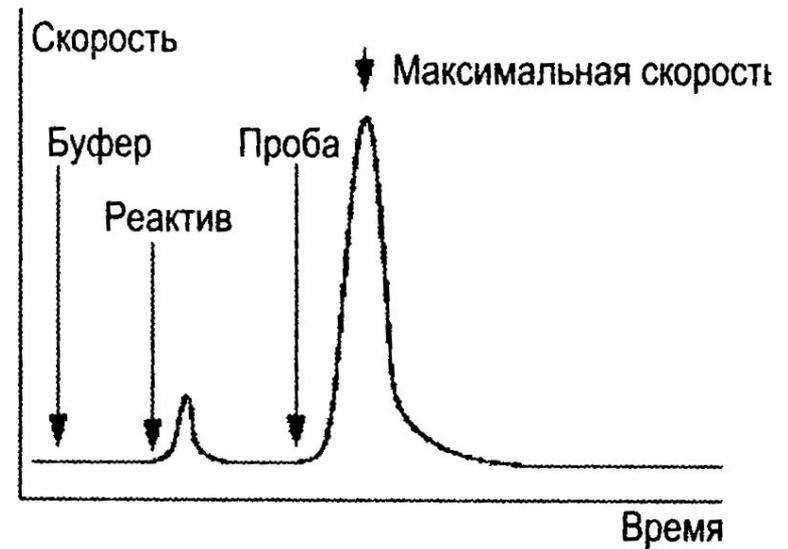
- **Измерение по начальной скорости**
- Скорость увеличивается в зависимости от количества фермента при одинаковой начальной концентрации субстрата
- Возникает в случае малого количества фермента
- Плато достигается, но время его достижения может быть большим.
- Регистрацию ведут на нелинейном участке



Кинетические кривые при разной низкой концентрации фермента и постоянной начальной концентрации субстрата. Начальная скорость удваивается при удвоении количества фермента, но кинетика нелинейна

Измерение по начальной скорости

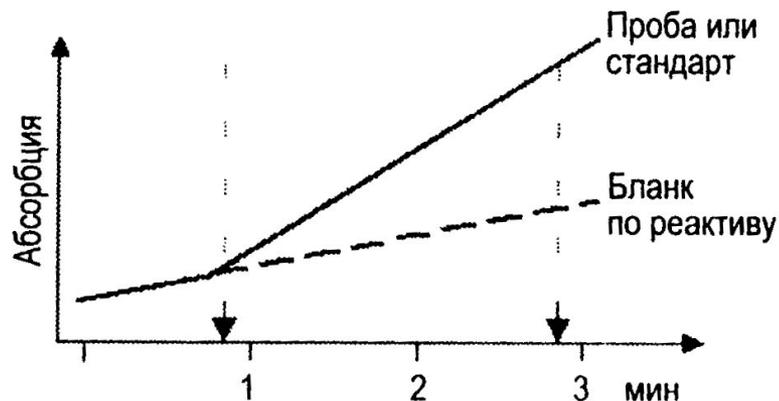
- Измерение скорости реакции. Регистрируется изменение в каждый момент времени светопропускания. Показатель, соответствующий максимальной скорости — значение максимальной скорости изменения оптического поглощения.
- Доступен только автоматическим анализаторам



Многоточечное измерение

- **Кинетический метод с коррекцией по blanku образца**
- Используется для определения активности ферментов и количественного измерения концентрации субстратов
- Одновременно может меняться blank рабочего реактива

$$C_{\text{пробы}} = \frac{\Delta D_{\text{пробы}} - \Delta D_{\text{blanka}}}{\Delta D_{\text{стандарта}} - \Delta D_{\text{blanka}}} \times C_{\text{стандарта}}$$



Кинетическое измерение с коррекцией по образцу blanka. Используется при нестабильном blanke. Возможные моменты измерения пробы указаны стрелками

- Современные приборы способны определять и отслеживать избыток антигенов автоматически (регистрация ускорения реакции после добавления дополнительного количества антигена – малые дозы калибратора)
- При постановке на обычном фотометре необходимо знать диагноз. Избыток антигена наблюдается в чрезвычайной ситуации. При миеломной болезни концентрация IgG может быть очень высокой, и исследование попадает в зону избытка антигена. Необходимо электрофоретическое исследование
- В качестве стандартов и контрольных материалов необходимо использовать стандарты и сыворотки, содержащие индивидуальные белки, концентрация которых измерена с использованием иммунохимической реакции

Фотометрические схемы измерения оптического поглощения растворов

Однолучевое фотометрирование

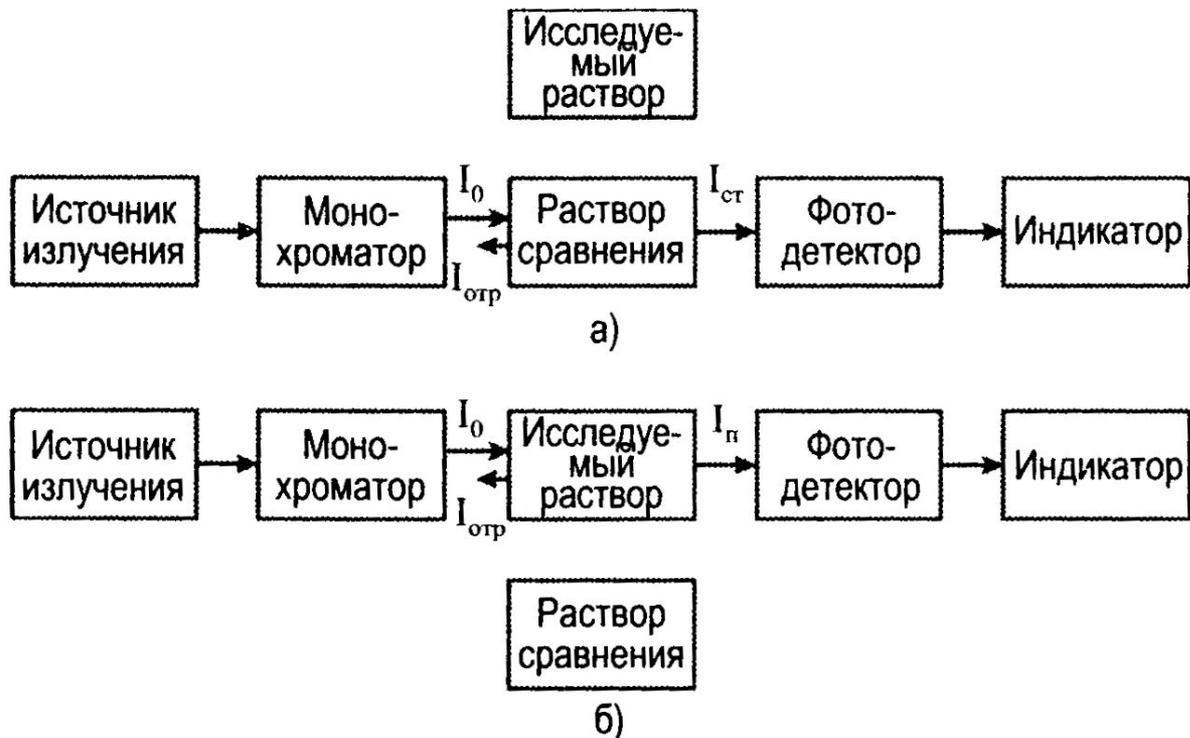
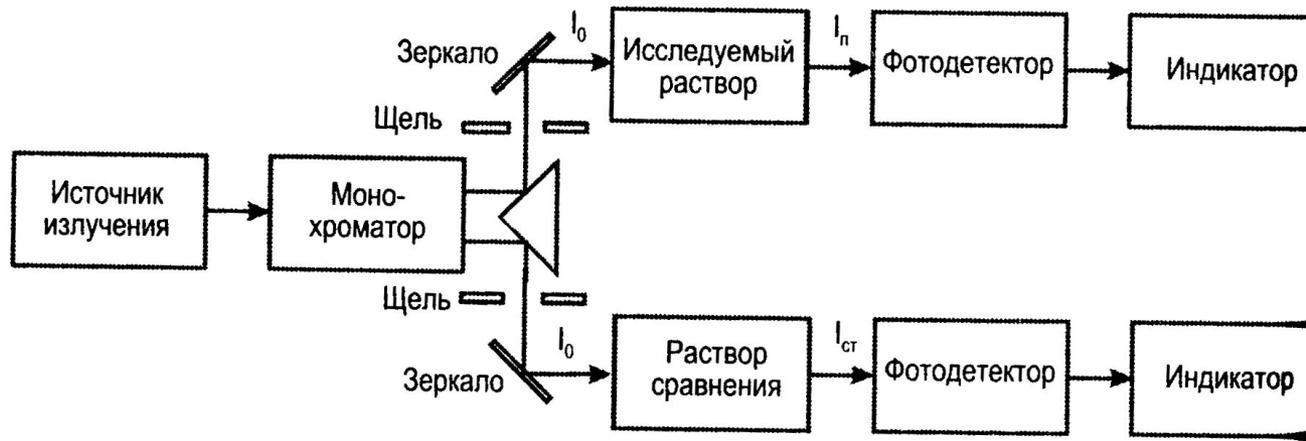


Схема однолучевого метода измерения оптической плотности исследуемого раствора относительно раствора сравнения в одной и той же спектральной полосе излучения. Последовательно измеряется оптическая плотность кюветы со стандартом и исследуемой пробой

Фотометрические схемы измерения оптического поглощения растворов

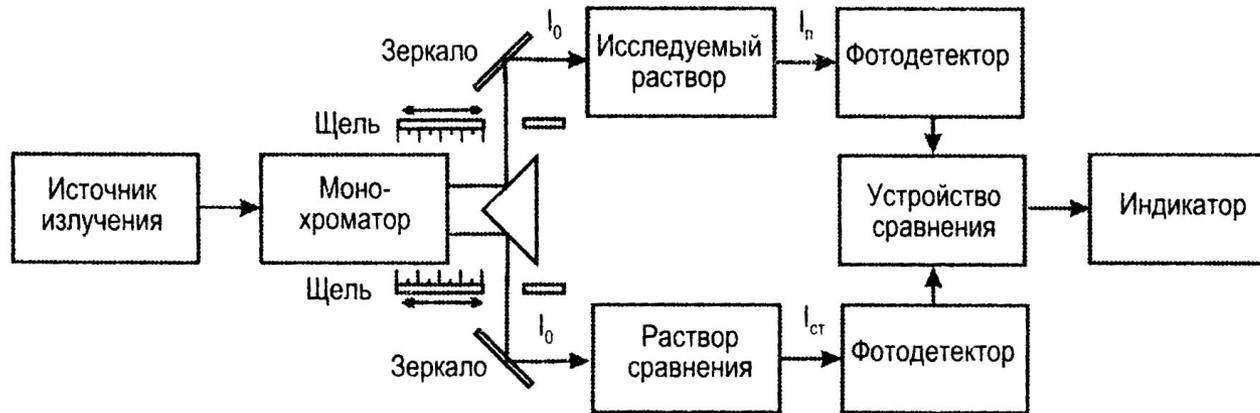
- Двухлучевое фотометрирование



Оптическая плотность исследуемого и сравнительного образцов измеряется одновременно на двух каналах. Сигналы поступают на 2 фотоприемника и представляются на 2-х индикаторах. Устраняется временная нестабильность источника излучения. Недостаток – наличие двух фотоприемников

Фотометрические схемы измерения оптического поглощения растворов

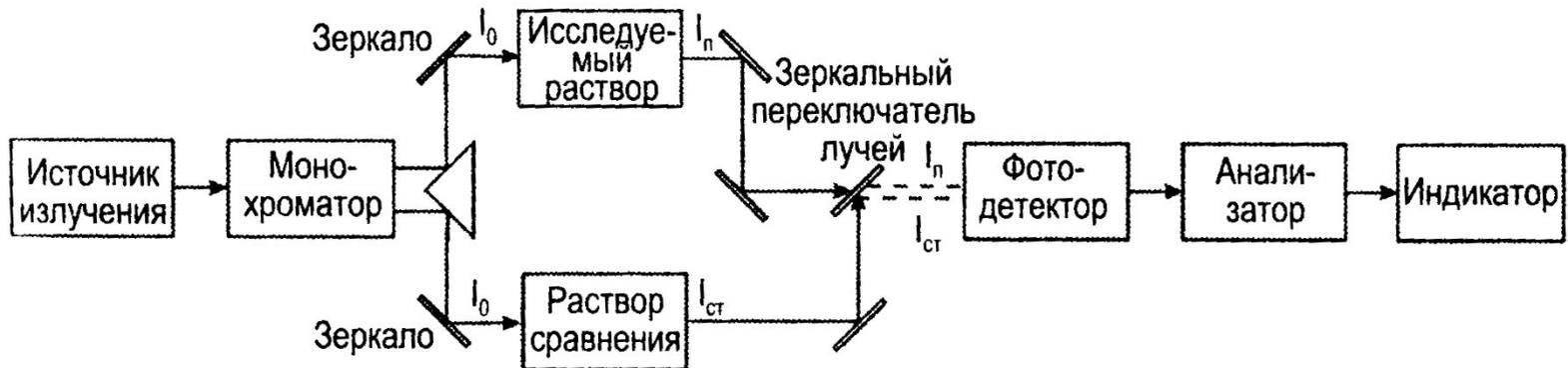
- Двухлучевое фотометрирование



Оптическая плотность исследуемого и сравнительного образцов измеряется одновременно на двух каналах, сигналы поступают на 2 фотоприемника и на устройство сравнения. Устройство сравнения может быть нуль-индикатором, в этом случае одной из щелей добиваются выравнивания сигнала в 2-х каналах или на индикатор может выводиться искомая величина

Фотометрические схемы измерения оптического поглощения растворов

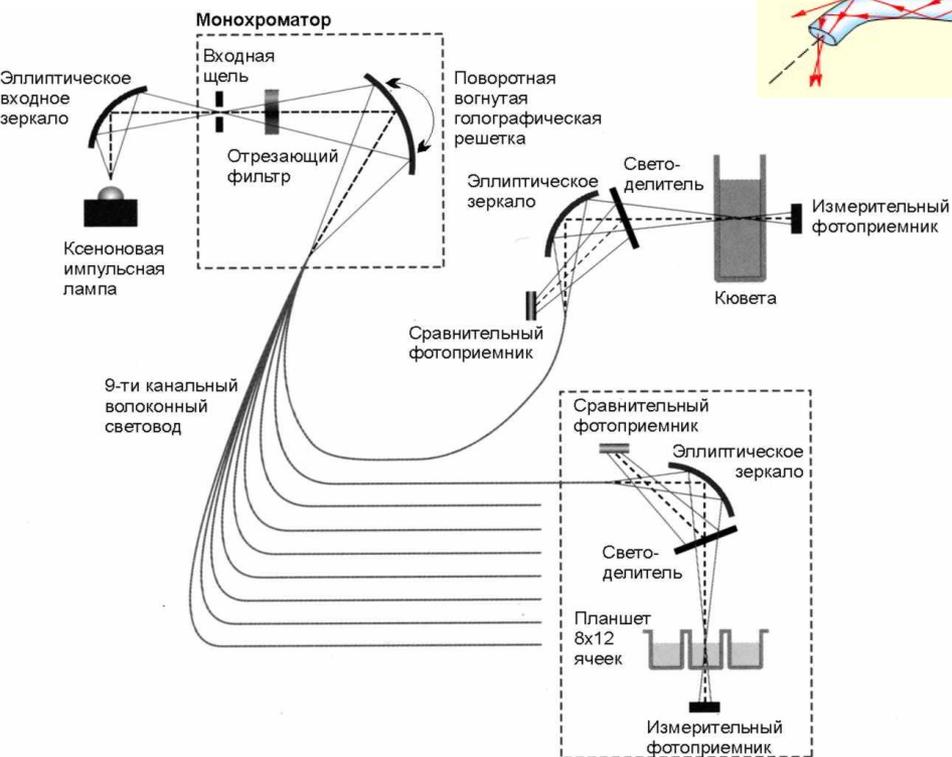
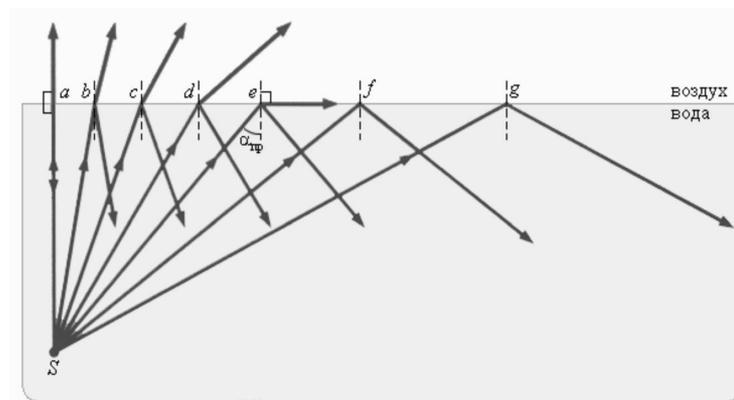
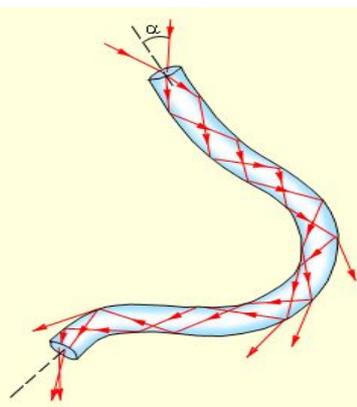
- Двухлучевое фотометрирование

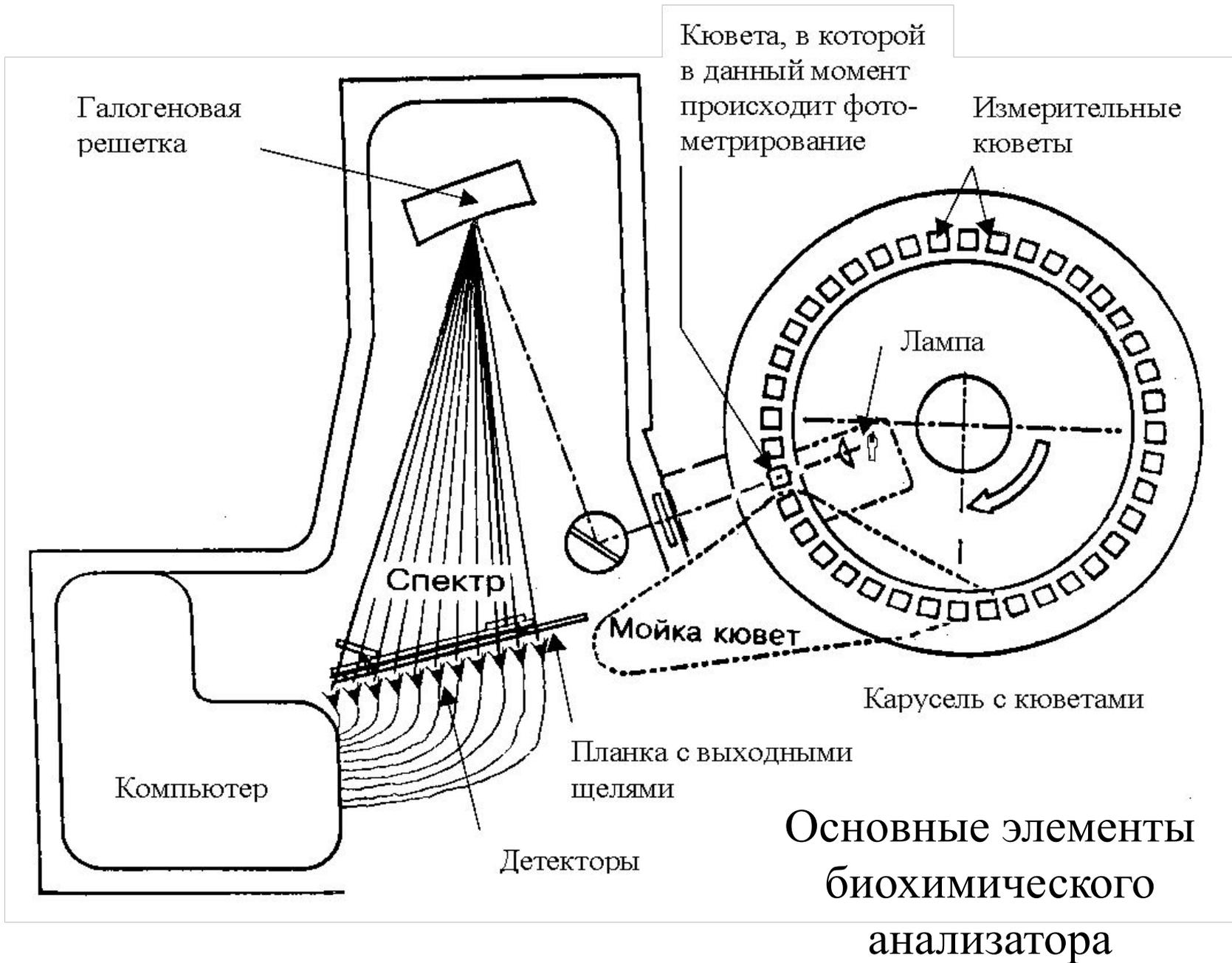


Разделение 2-х лучей во времени с одним монохроматором, одним фотоприемником и анализатором.

Два луча от монохроматора приходят на вращающийся диск с зеркальными и прозрачными секциями (переключатель лучей). Короткие импульсы 2-х лучей, разделенные во времени, поступают на один фотоприемник. Импульсные сигналы сравниваются анализатором и на индикатор поступает искомая величина. Устраняется временная нестабильность источника излучения и фотоприемника. Наиболее точная схема измерения

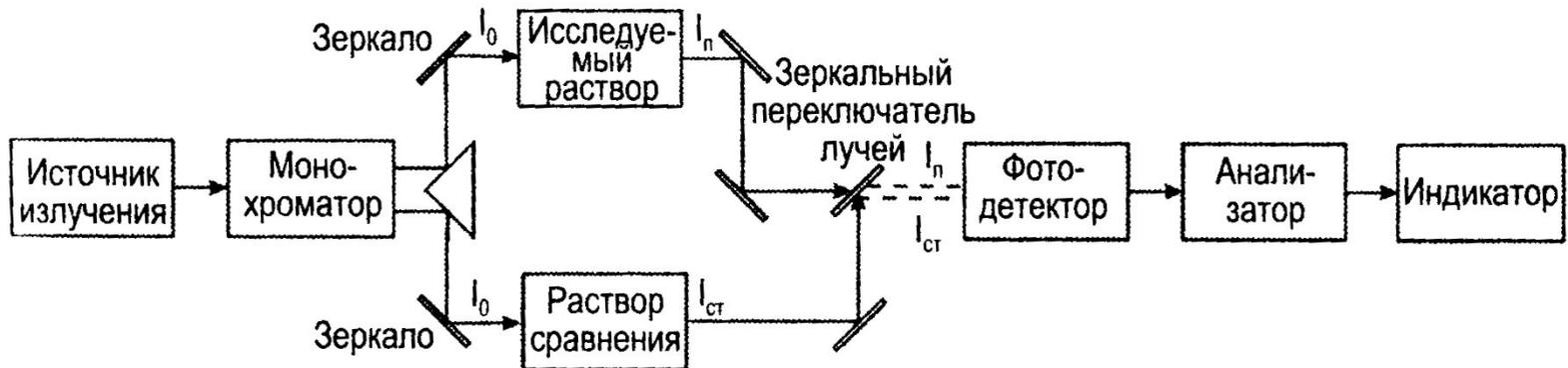
Волоконный световод минимизирует оптическую схему





Фотометрические схемы измерения оптического поглощения растворов

- Двухлучевое фотометрирование



Разделение 2-х лучей во времени с одним монохроматором, одним фотоприемником и анализатором.

Два луча от монохроматора приходят на вращающийся диск с зеркальными и прозрачными секциями (переключатель лучей). Короткие импульсы 2-х лучей, разделенные во времени, поступают на один фотоприемник. Импульсные сигналы сравниваются анализатором и на индикатор поступает искомая величина. Устраняется временная нестабильность источника излучения и фотоприемника. Наиболее точная схема измерения

Рассеяние света

Мутный раствор в кювете

- - поглощает свет (если окрашен)
- - частично проходит, не изменяя направления (трансмиссия)
- - частично рассеивается, изменяя направление под различными углами (рассеивание)

Рассеяние света

Трансмиссия и рассеивание зависят от

- - длины волны светового потока
- - частоты светового потока
- - интенсивности светового потока
- - свойств рассеивающей среды (размера и формы частиц, количества, способности к поляризации и др)
- Если в процессе измерения размер частиц в растворе меняется, будет меняться поток проходящего и рассеивающего света

Определение светорассеивания

Зависит от

- длины волны (λ)
- Диаметра частиц, на которых происходит рассеивание

Если размер частиц значительно меньше длины волны светового потока ($< \lambda/10$) – упругое рассеяние

Интенсивность потока, рассеиваемого
небольшими частицами, подчиняется
уравнению Релея

$$I_r = I_0 \cdot \frac{n_1^2 - n^2}{(n_1^2 + 2n^2)} \cdot \frac{NV^2}{\lambda^4 d^2} \cdot (1 + \cos^2 \beta),$$

I_r и I_0 – интенсивность рассеянного и падающего света, n_1 и n – коэффициенты преломления частиц и среды, N – общее число частиц, V – объем частиц, λ – длина волны падающего света, d – расстояние до наблюдателя, β – угол, образованный падающим и рассеянным светом

При лабораторных исследованиях величины V , n_1 , n , λ , d и β – известны и постоянны для исследуемого вещества, $N = C \cdot b$. C – концентрация вещества, b – толщина раствора.

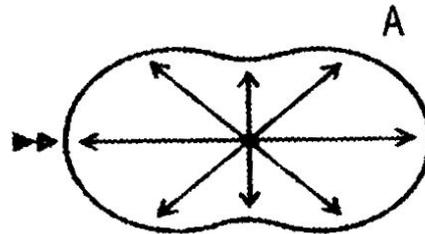
Для определенного угла формула принимает вид

Известные параметры объединены в коэффициент k

$$\frac{I_r}{I_0} = k \cdot C$$

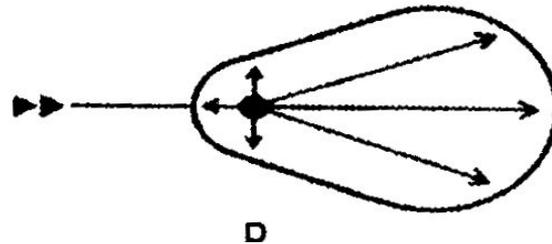
В основе рассеяния малых частиц лежит явление дифракции

- Рассеяние света каждой частицей не зависит друг от друга.
- Рассеянный свет распространяется во всех направлениях
- Максимальное количество света рассеивается под углом 0 и 180°



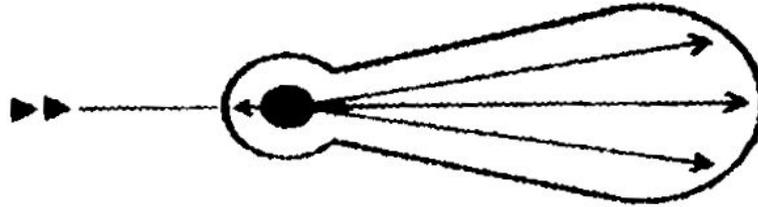
- При λ 400нм – такой тип рассеивания характерен для частиц диаметром < 40 нм (иммуноглобулины, β -липопротеины, альбумин)

При увеличении размеров частиц (40-400 нм) рассеивание становится несимметричным



- Максимальное количество света рассеивается в направлении падающего луча
- При λ 400нм (Ig M, хиломикроны, формирующиеся комплексы антигенов с иммуноглобулинами)

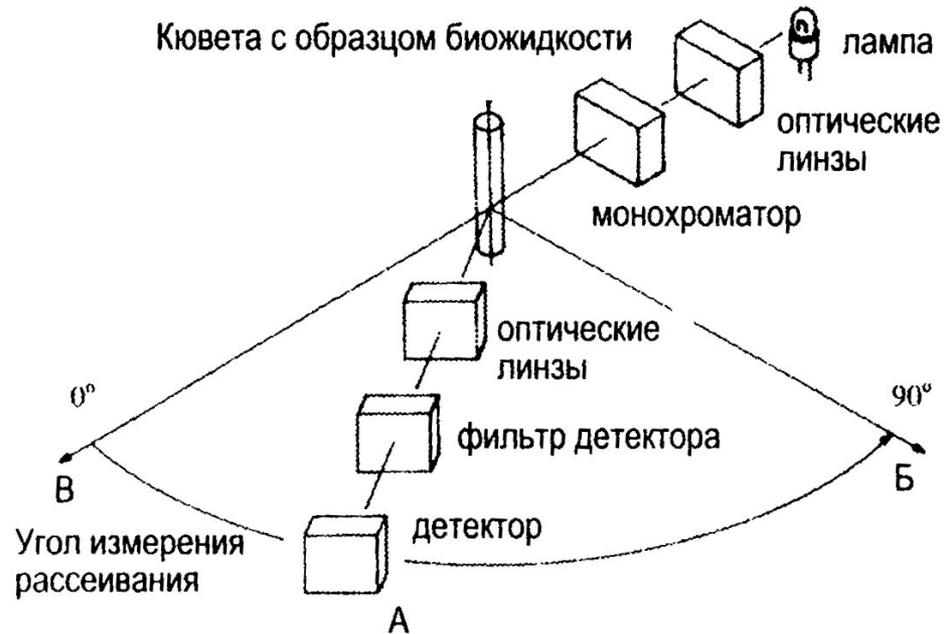
При превышении длины света (диаметр > 400 нм) несимметричность светорассеяния увеличивается



- Характерен для взвеси бактерий, клеток крови (тромбоциты, эритроциты)

Нефелометрия

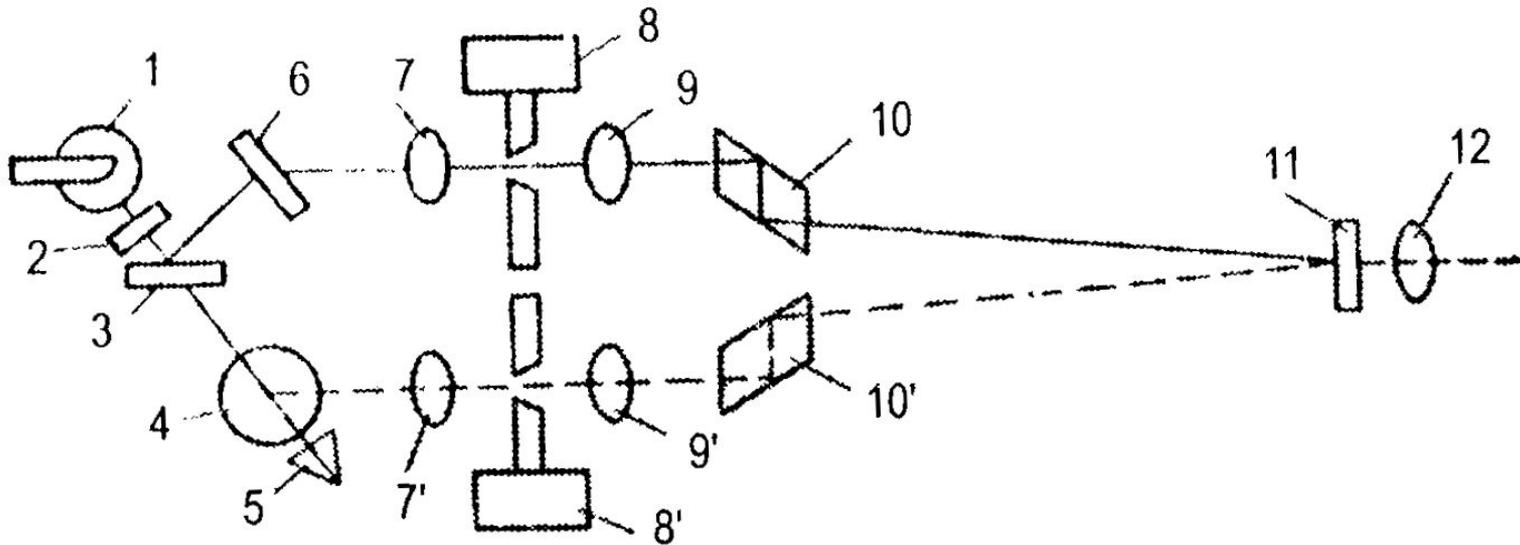
- Измерение рассеянного света
- Сравнимая величины рассеянного и падающего света можно определять концентрацию вещества в растворе



А – нефелометр, регистрирующий малоугловое рассеяние

Б- нефелометр, регистрирующий рассеяние под углом 90°

Оптическая схема нефелометра



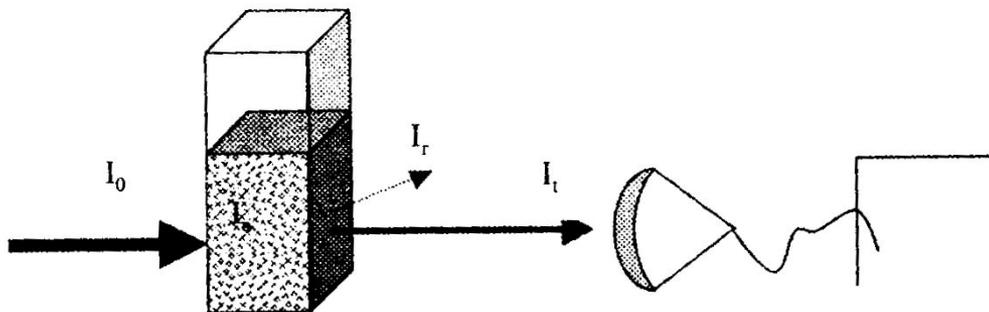
1 – лампа, 2, 11 – светофильтры; 3 – стеклянная пластинка, разделяющая свет на 2 пучка; 4 – кювета с исследуемым раствором; 5 – ловушка света; 7, 8, 9 – линзы; 8 – уравнивательные диафрагмы; 10 – ромбические призмы; 12 - окуляр

Свет разделяется на 2 пучка – один проходит через раствор исследуемого вещества, другой – через канал сравнения

Источник света – лампы или лазерные источники излучения (высокая интенсивность излучения, строгая направленность, строгая фиксированная длина волны – идеален для нефелометрии)

Турбидиметрия

- Измерение прошедшего света
- Турбидиметры построены по типу фотометров



Интенсивность прошедшего светового потока определяется уравнением

$$\lg \frac{I_t}{I_0} = k \frac{Cbd^3}{d^4 + \alpha\lambda^4},$$

I_0 – интенсивность падающего света

I_t – интенсивность потока, прошедшего через раствор

C – концентрация рассеивающих частиц

B – толщина поглощающего слоя

d – средний диаметр рассеивающих частиц

k и α – константы, зависящие от природы вещества и метода измерения

λ – длина волны

Турбидиметрия

При постоянных b , d , k , α и λ получим $\lg \frac{I_t}{I_0} = tC$ или $I_t = I_0 \cdot 10^{-tC}$

Выражение, подобное закону Бугера-Ламберта для окрашенных растворов

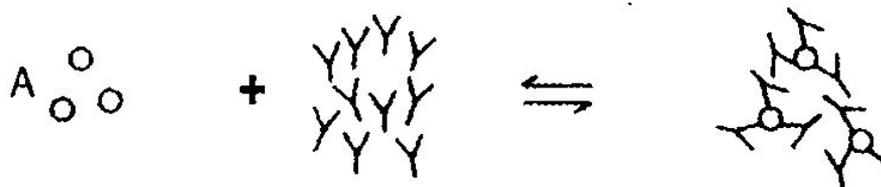
- t – молярный коэффициент мутности раствора (турбидность)
- В качестве турбидиметров можно использовать большинство фотометров и биохимических анализаторов
- Обычно используются короткие волны (340 нм), т.к. доля рассеянного света увеличивается обратно пропорционально четвертой степени длины волны – т.е. при меньшей длине волны прошедший свет будет составлять большую часть от падающего, для более короткого ультрафиолета нужна специальная оптика

Турбидиметрия и нефелометрия

- Используются для определения индивидуальных белков
- Особенность – построение калибровочного графика с использованием не менее пяти концентраций (калибровочный график имеет нелинейный характер)

Кривая доза-эффект

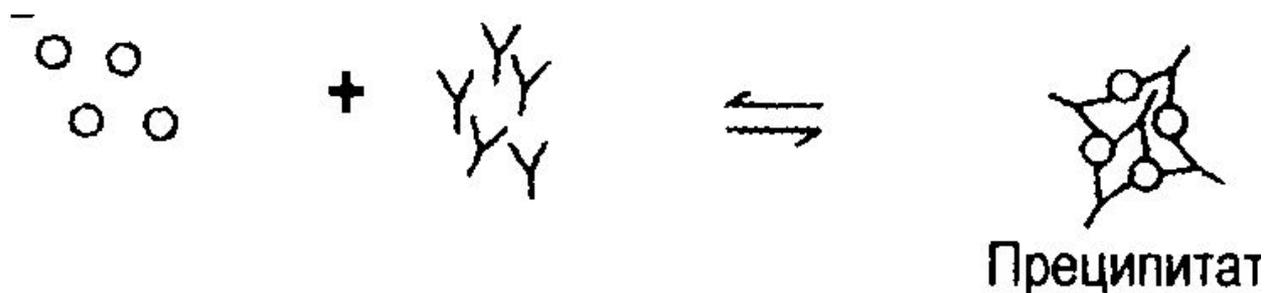
- При взаимодействии антиген-антитело образуют агрегаты



При постоянной концентрации антител при невысокой концентрации антигена все антигена связываются с антителами. При осаждении комплексов центрифугированием – в супернатанте – несвязанные антитела – **избыток антител. Преципитат не образуется**

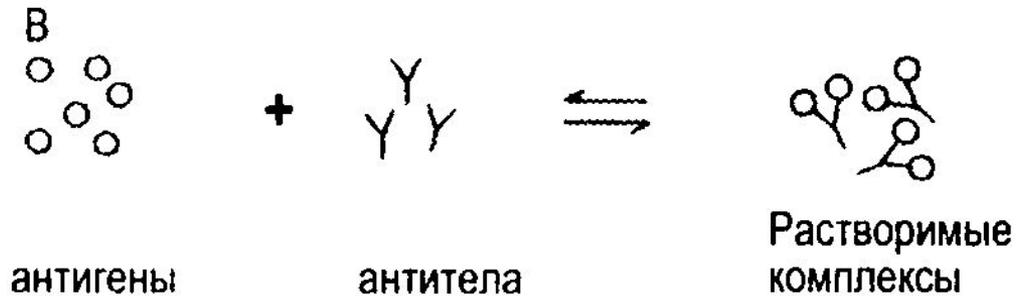
Кривая доза-эффект

- При пропорциональной концентрации антигенов и антител комплекс выпадает в осадок – **преципитат**. В супернатанте не определяются антитела и антигены – **эквивалентное состояние**



Кривая доза-эффект

- При увеличении концентрации антигенов количество антител недостаточно для полного связывания белка.



- Частицы иммунных комплексов становятся мелкими, **преципитат не формируется**. В супернатанте – свободные антигены – **антиген-эксцесс**

Кривая доза-эффект

- Классическая преципитационная кривая Хайдельберга-Кендала

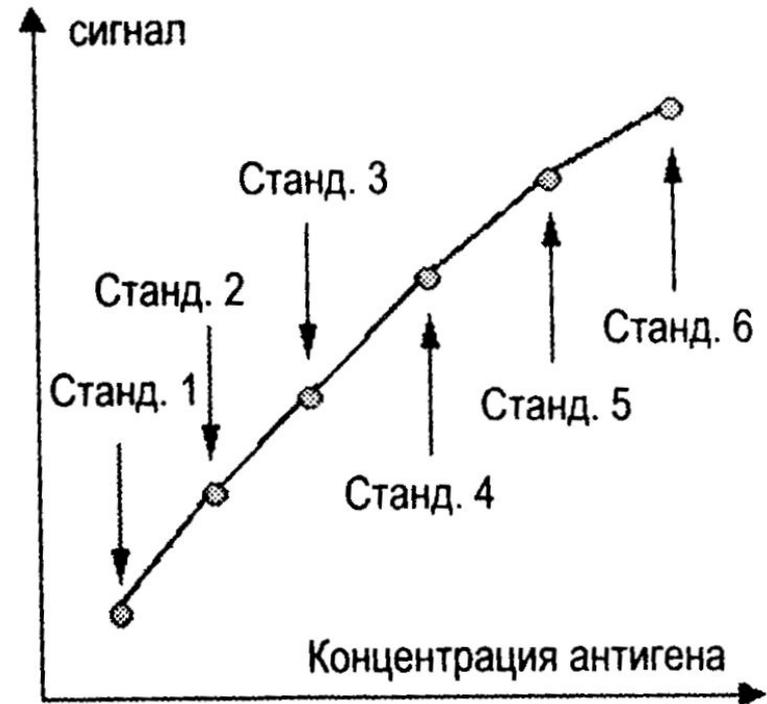


- 1) **Зона избытка антител** – величина преципитатов увеличивается по мере добавления антигенов. В супернатанте свободные антитела
- 2) **Зона соответствия антигена и антитела** – максимальная преципитация. В супернатанте нет свободных антител и антигенов
- 3) **Зона избытка антигенов.** Формирование небольших иммунных комплексов, а не преципитат. В супернатанте – свободные антигены

Калибровочный график

- **Строится для**
 - каждого индивидуального белка
 - каждого прибора
 - при любом условий регистрации
 - периодически при проведении исследований

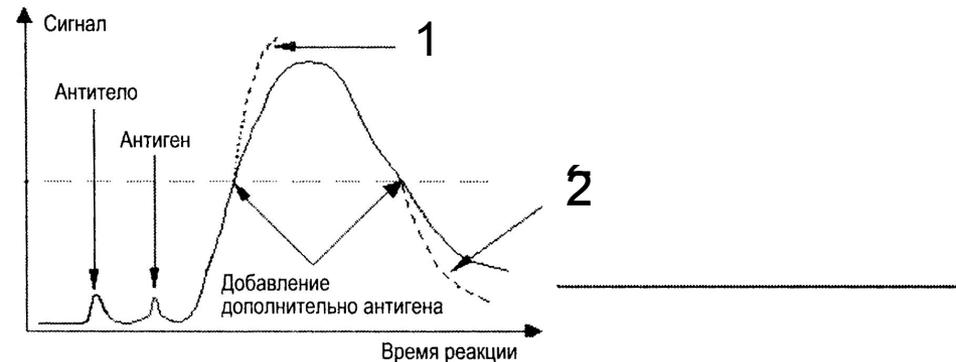
При серийных исследованиях в стандартных условиях допускается корректировка графика на основании измерения одного из стандартов. (вид стандартной кривой не меняется из-за влияния систематических факторов, происходит параллельный сдвиг всего графика)



Для построения графика требуется по крайней мере 5 стандартных растворов

1- если после добавления антигена реакция ускоряется, имеет место избыток антител (измерение проводится правильно)
Состав реакционной смеси подбирается так, чтобы измерение производилось в зоне избытка антител.

- При очень высокой концентрации белка антител недостаточно, частицы преципитата становятся мелкими (нисходящая часть кривой) – с увеличением концентрации белка сигнал прибора уменьшается. Может быть выдан неправильный результат.
- Проводят разведение биологической жидкости
- Если сигнал увеличивается – определение проводилось в нисходящей части кривой
- Разведение проводят до степени избытка антител



1- если после добавления антигена реакция ускоряется, имеет место избыток антител (измерение проводится правильно)

2- если после добавления антигена реакция не ускоряется, имеет место избыток антигена (измерение проводится неверно)

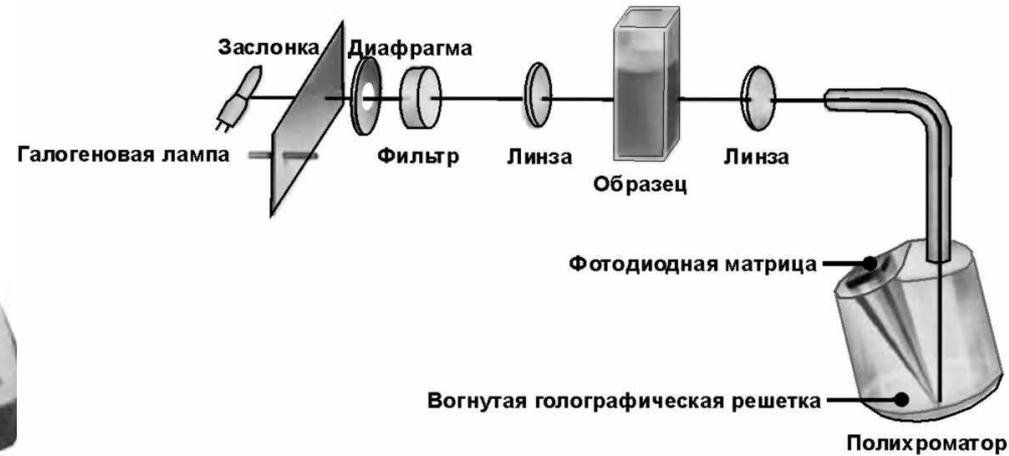
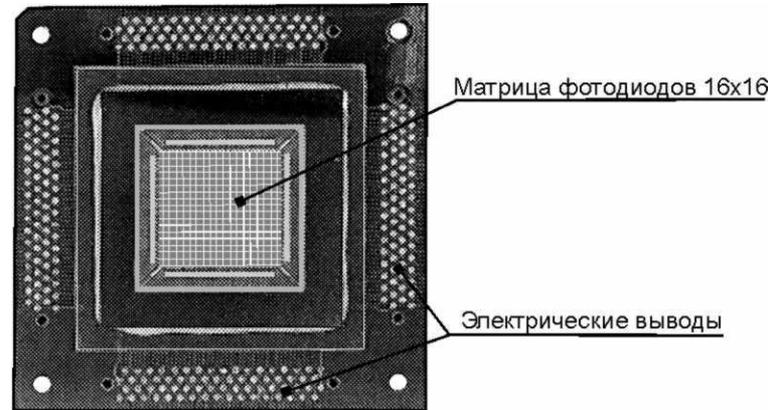
- Современные приборы способны определять и отслеживать избыток антигенов автоматически (регистрация ускорения реакции после добавления дополнительного количества антигена – малые дозы калибратора)
- При постановке на обычном фотометре необходимо знать диагноз. Избыток антигена наблюдается в чрезвычайной ситуации. При миеломной болезни концентрация IgG может быть очень высокой, и исследование попадает в зону избытка антигена. Необходимо электрофоретическое исследование
- В качестве стандартов и контрольных материалов необходимо использовать стандарты и сыворотки, содержащие индивидуальные белки, концентрация которых измерена с использованием иммунохимической реакции

СНАЧЕМО ЗАБРАНИМО

КЛИНИЧЕСКИЙ СПЕКТРОФОТОМЕТР



Спектрофотометр без монохроматора



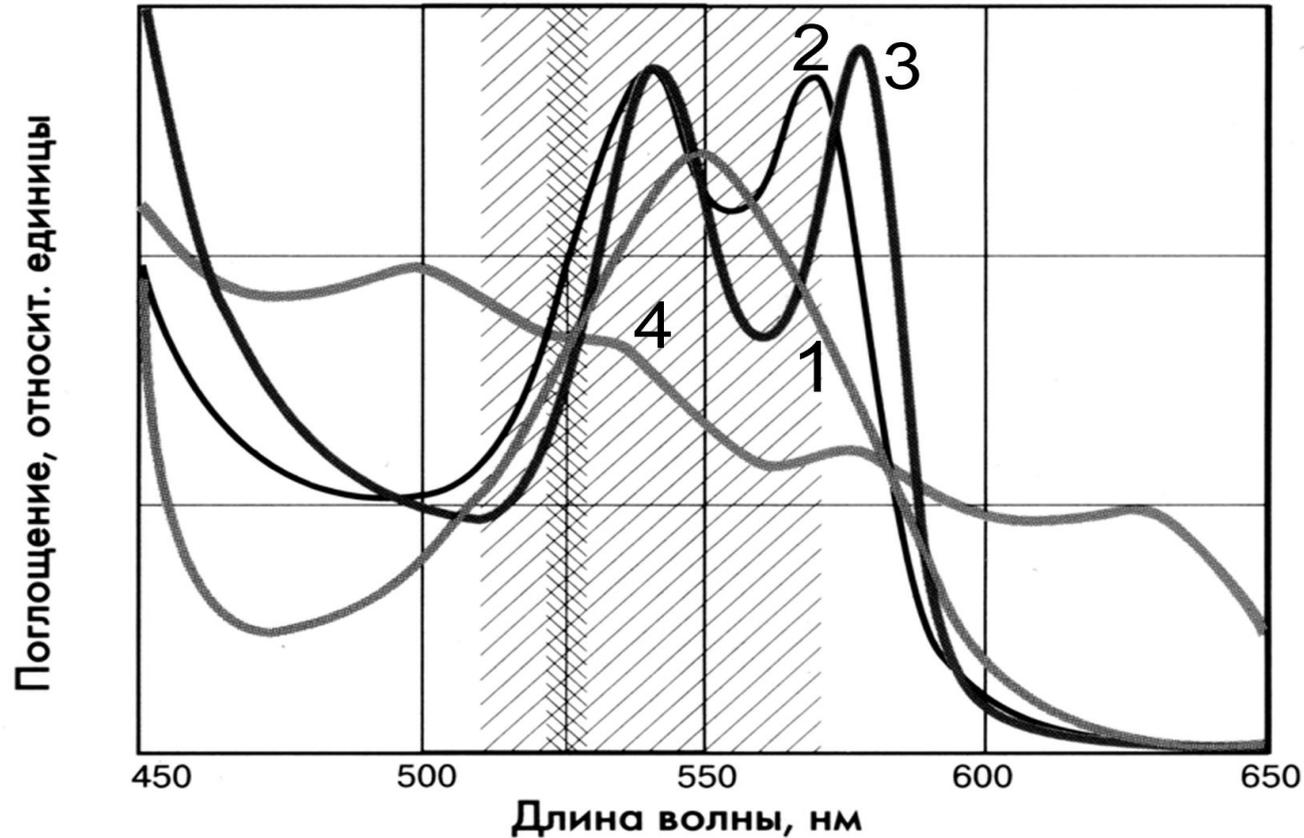
Кормей-мульти – программируемый фотометр с проточной кюветой



$$I_r = I_0 \cdot \frac{n_1^2 - n^2}{(n_1^2 + 2n^2)} \cdot \frac{NV^2}{\lambda^4 d^2} \cdot (1 + \cos^2 \beta),$$

$$\frac{I_r}{I_0} = k \cdot C$$

Спектр поглощения производных гемоглобина



спектры поглощения производных гемоглобина: 1 – дезоксигемоглобина (HbH); 2 – карбоксигемоглобина (HbCO) 3 – оксигемоглобина (HbO_2); 4 – метгемоглобина (MetHb).

КДЛ амбулаторно- поликлинического звена

Состоявшееся решение - укрепить оснащенность ЛПУ оборудованием, в т.ч. лабораторным

- А) создан табель оснащения КДЛ
- Б) из Федерального Фонда выделены средства на закупку оборудования
- В) проведен тендер на закупку 4 комплектов (ЛОТов) лабораторного оборудования
- Г) на основании заявок с территорий составлен реестр распределения оборудования