

# 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.

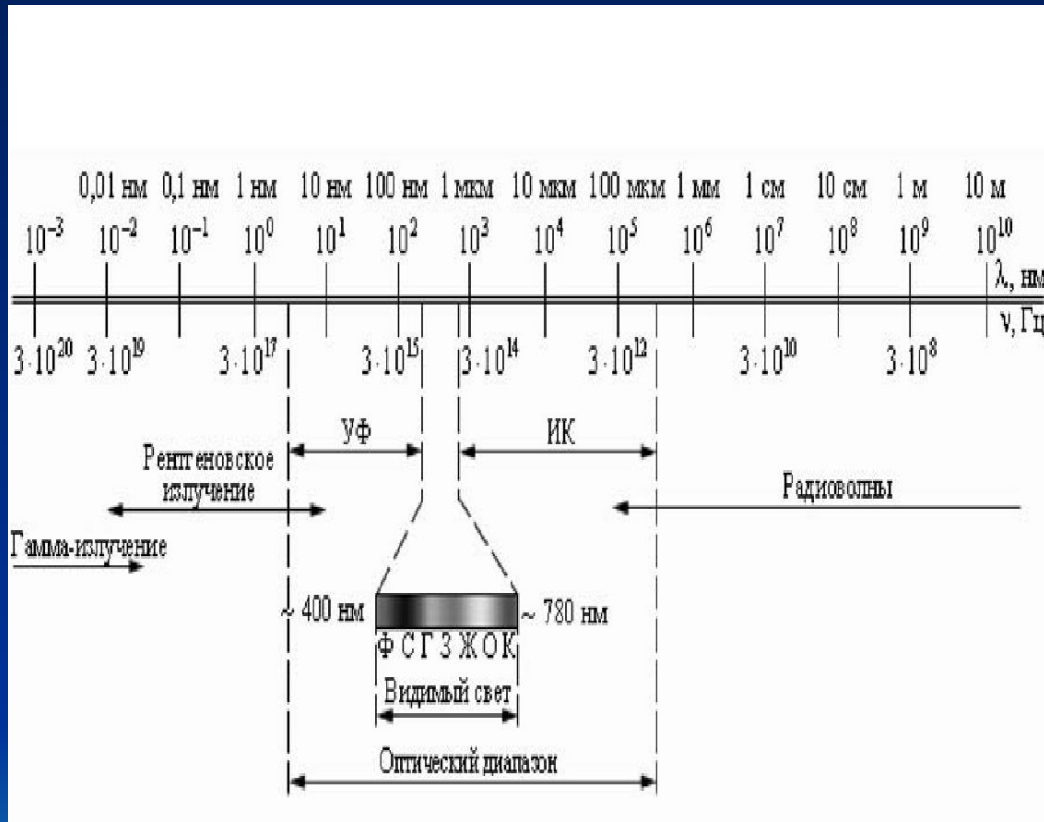
**Потенциометрия** объединяет методы, основанные на измерении ЭДС обратимых электрохимических цепей, когда потенциал рабочего электрода близок к равновесному значению.

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**.

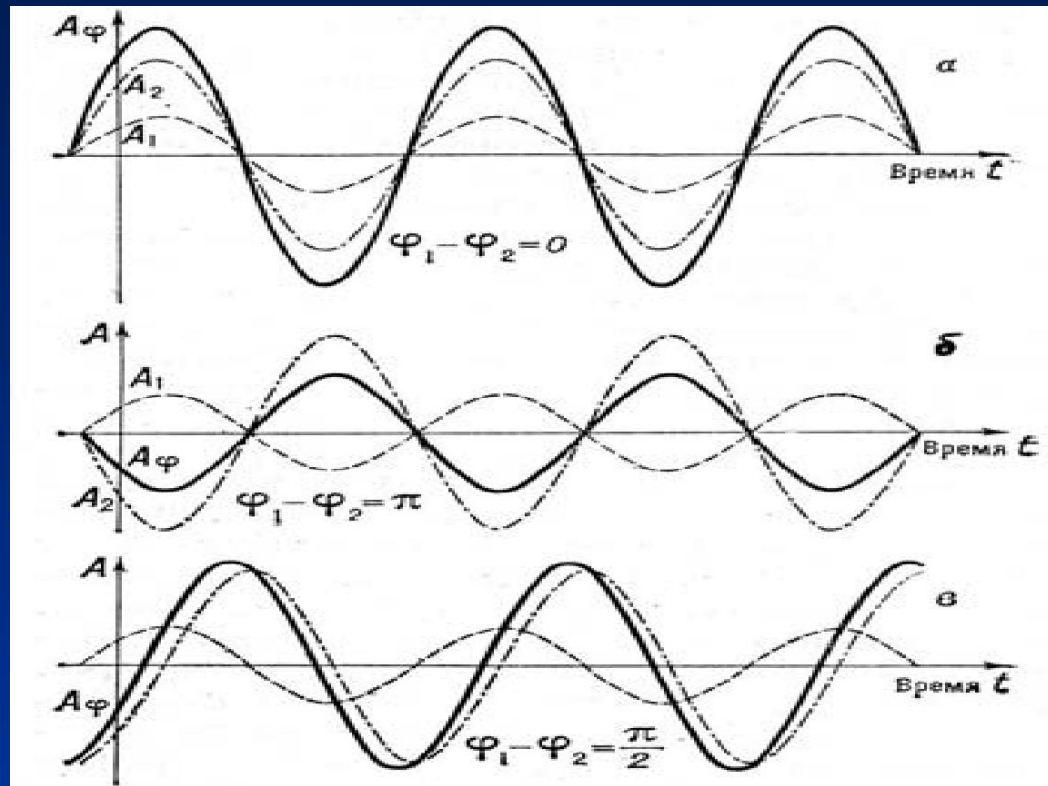
Основной волновой характеристикой света является **длина волны  $\lambda$** , выражаемая в нм, мкм, или см.

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.

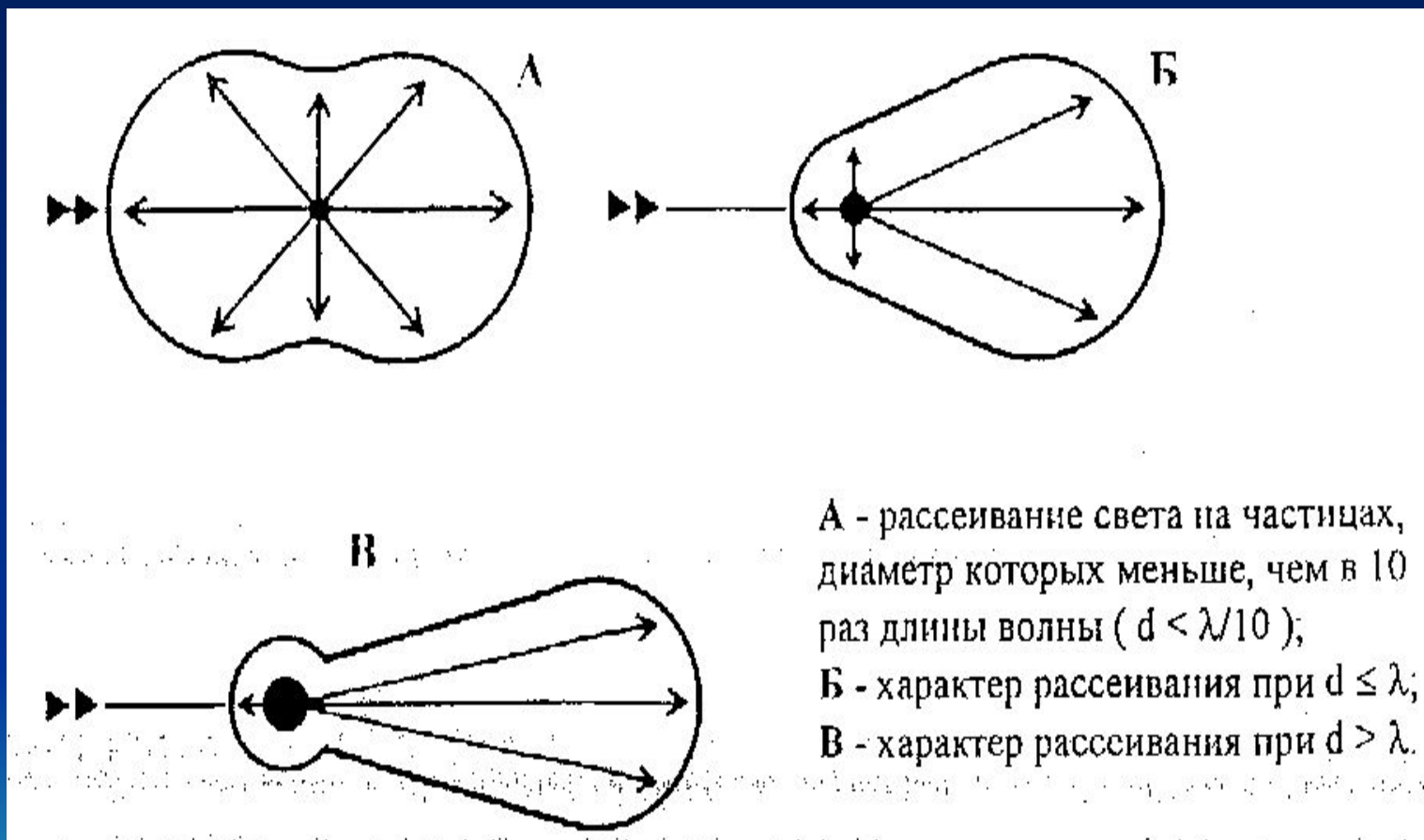


# Нефелометрия

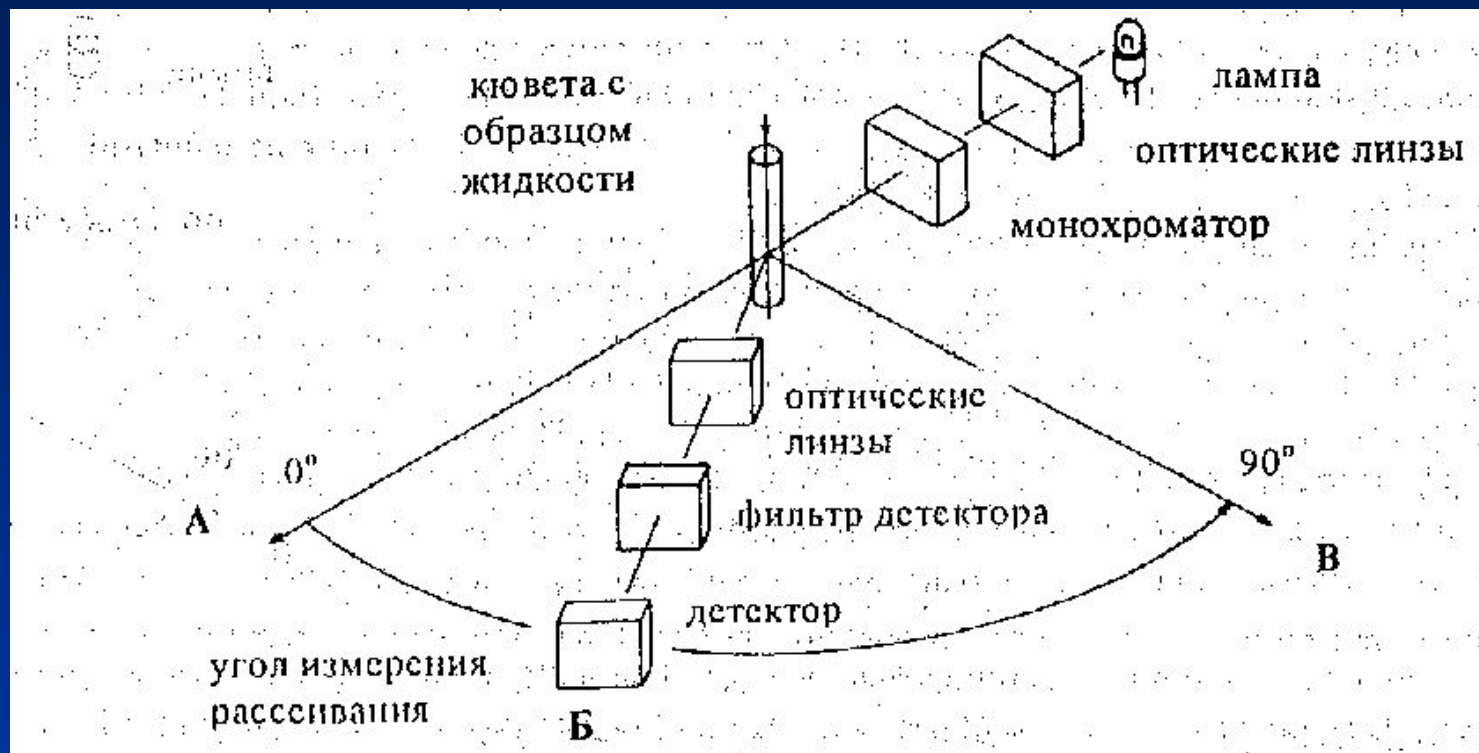
- **Нефелометрия** основана на феномене рассеивания света, когда падающий луч ударяется в частицу или комплекс антиген — антитело в растворе. В результате этого количество рассеянного света пропорционально количеству антигена.
- Нефелометрию типично используют для определения уровня специфических белков, 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

|                                           |                                          |                                           |                                         |                          |
|-------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|
| <b><math>\alpha</math>1-микроглобулин</b> | <b><math>\beta</math>2-Микроглобулин</b> | <b><math>\alpha</math>2-Макроглобулин</b> | <b>Альбумин</b>                         | <b>Общий белок</b>       |
| <b>Фибронектин</b>                        | <b>Цистатин С</b>                        | <b>Легкие цепи 'λ'</b>                    | <b>Легкие цепи 'κ'</b>                  | <b>Своб. легкие цепи</b> |
| <b>ASLO, RF, CRP sen</b>                  | <b>Церулоплазмин</b>                     | <b><math>\alpha</math>1-Гликопротеин</b>  | <b><math>\alpha</math>1-Антитрипсин</b> | <b>ADNase, SAA</b>       |
| <b>Гаптоглобин</b>                        | <b>Ретинол св. белок</b>                 | <b>Преальбумин</b>                        | <b>Трансферрин</b>                      | <b>Миоглобин</b>         |
| <b>АРО А-I</b>                            | <b>АРО-B</b>                             | <b>АРО-E</b>                              | <b>LP(a)</b>                            | <b>АРО А-II</b>          |
| <b>IgG, IgE</b>                           | <b>IgA, IgM</b>                          | <b>IgG1, IgG2</b>                         | <b>IgG3, IgG4</b>                       | <b>ЦИК</b>               |
| <b>С3с, С4</b>                            | <b>С1-ингибитор</b>                      | <b>Плазминоген</b>                        | <b>Фибриноген</b>                       | <b>Антитромбин-III</b>   |
| <b>Гемопексин</b>                         | <b>Раств. трансф. рец.</b>               | <b>Трансферрин, CDT</b>                   | <b>Ферритин</b>                         | <b>Гомоцистеин</b>       |



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



# Фотометрия



*в современной  
лаборатории*

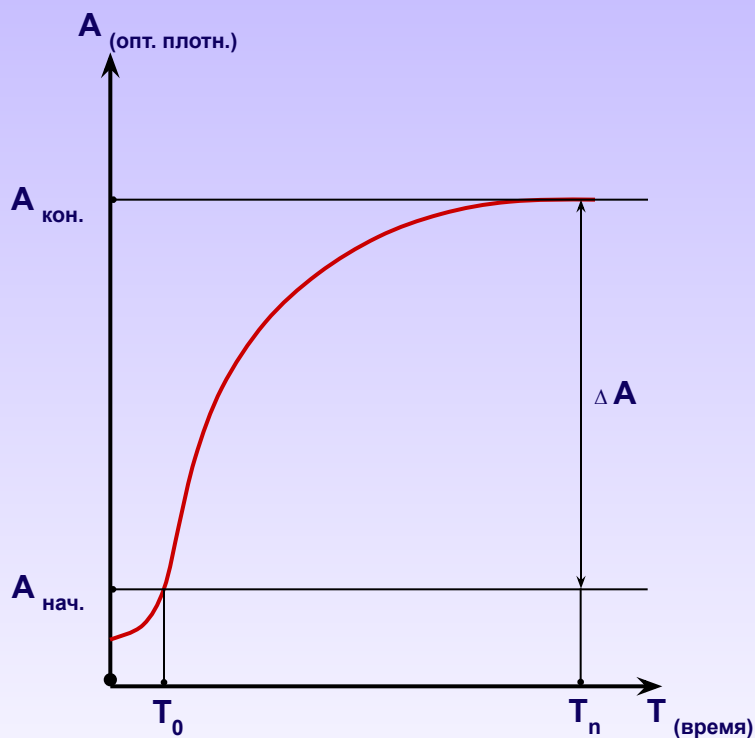


# Измерения по «конечной точке»



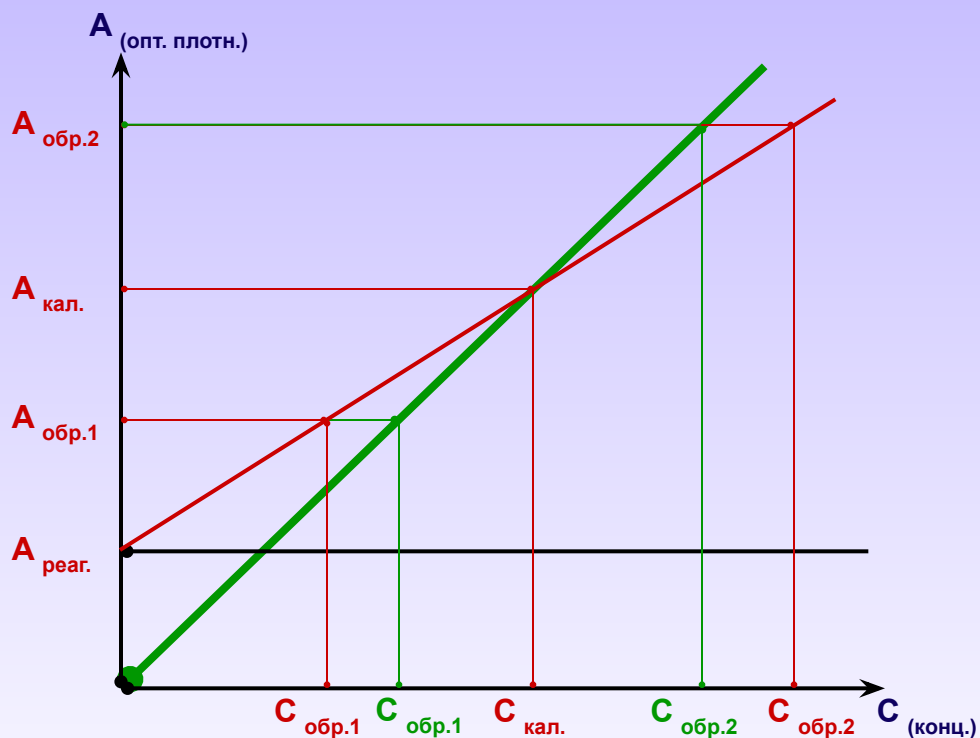
## Кривая реакции

(изменение оптической плотности  
в зависимости от времени)



## Калибровочный график

(зависимость оптической плотности  
от концентрации)



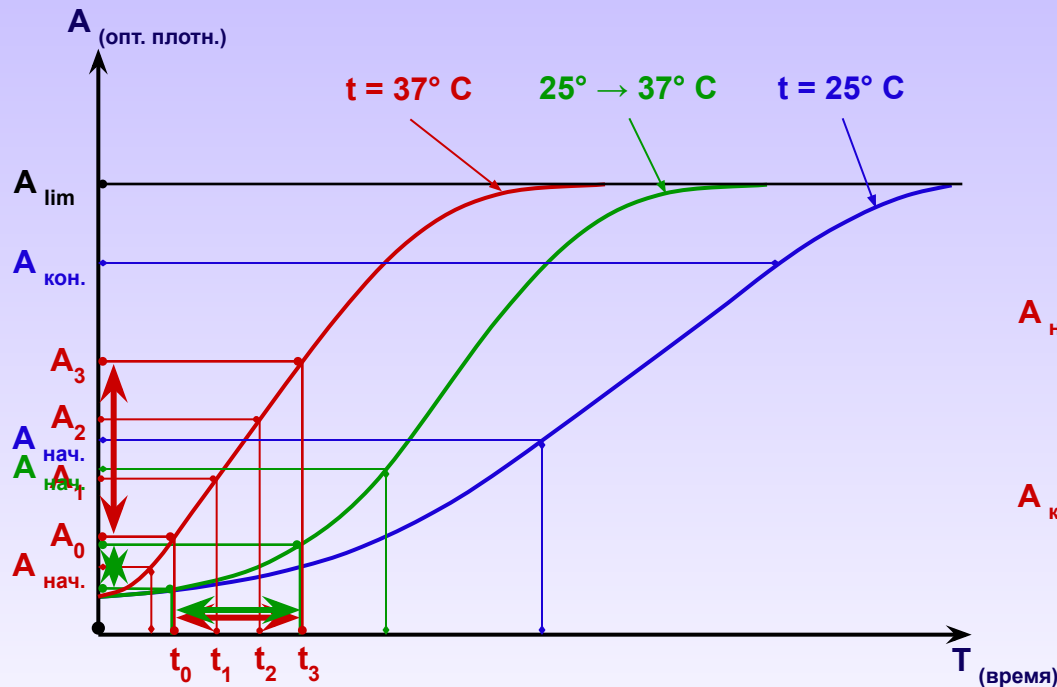
$$C_{\text{обр.}} = \frac{A_{\text{обр.}} - A_{\text{реак.}}}{A_{\text{кал.}} - A_{\text{реак.}}} \times C_{\text{кал.}}$$

# Кинетические измерения



## Кривая реакции

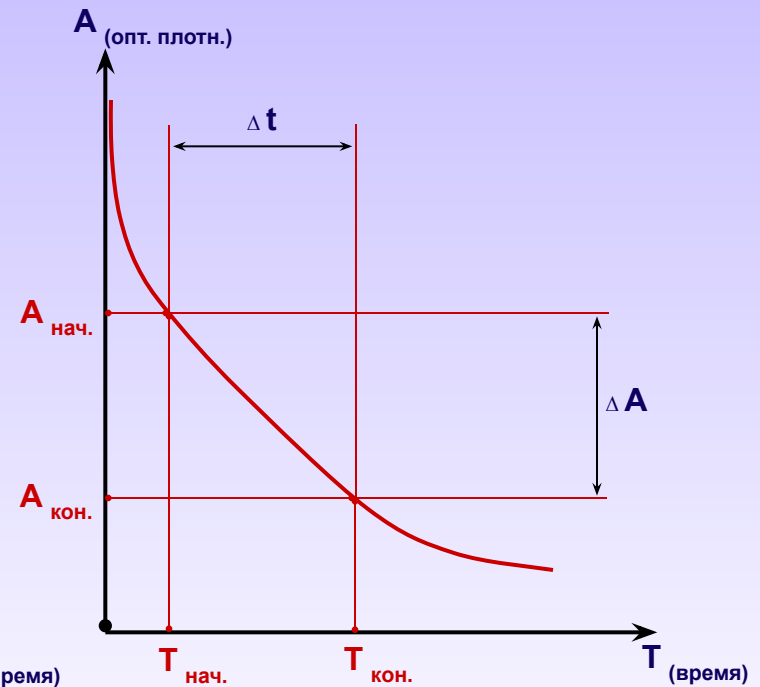
(увеличение оптической плотности в зависимости от времени)



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

## Кривая реакции

(уменьшение оптической плотности в зависимости от времени)

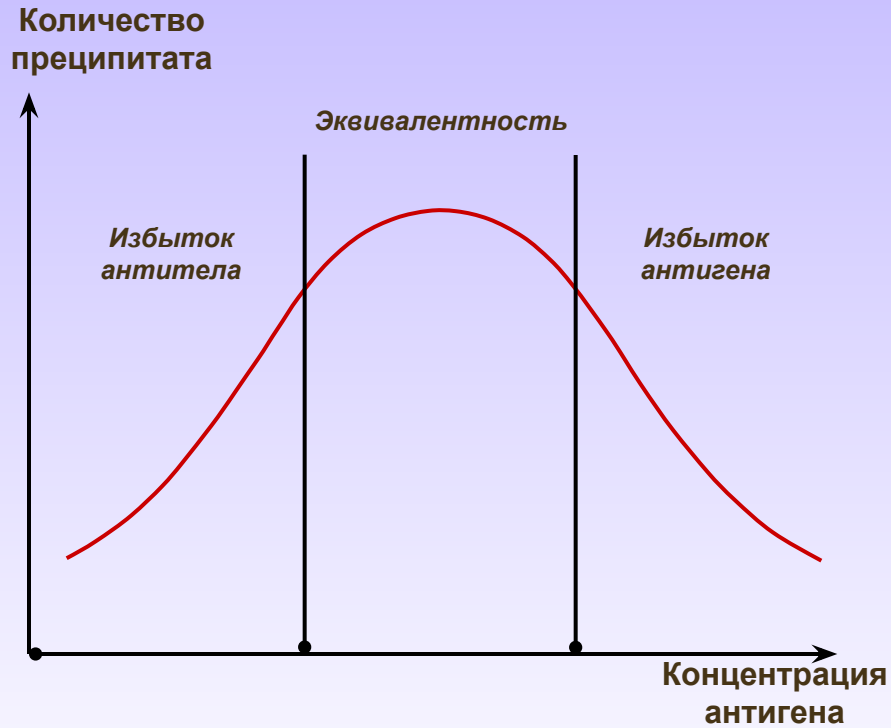


# Нелинейная многоточечная калибровка



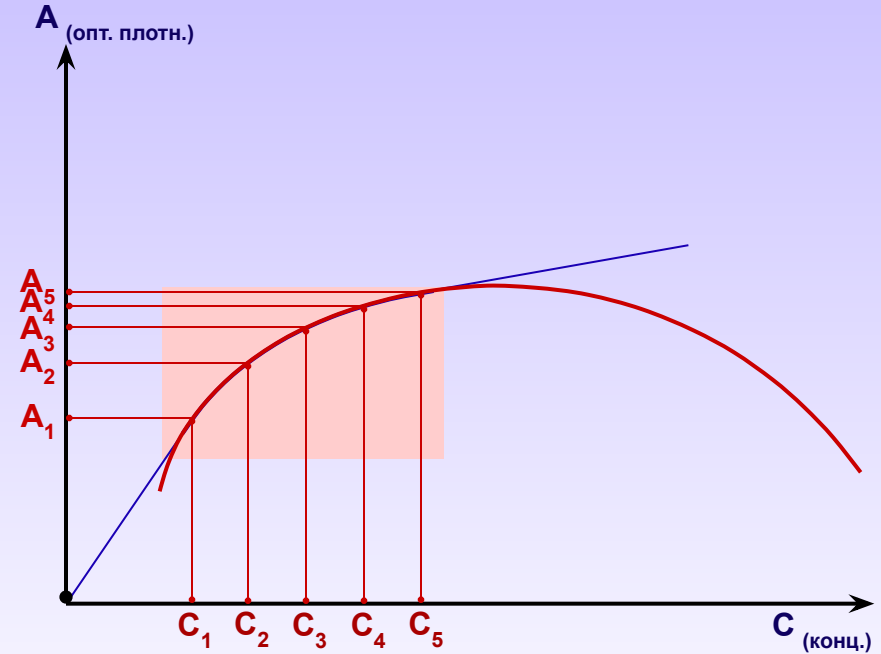
## Кривая реакции

(изменение оптической плотности в зависимости от времени)



## Калибровочный график

(зависимость оптической плотности от концентрации)



# 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.



# 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 дифракционной 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.
- К 2-ой - способы определения субстратов с помощью ферментов.
- К 3-ей - методы исследования активности ферментов.
- К 4-ой - методы иммунохимического анализа.



# 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.**
- К 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



# 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 ( ensime 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

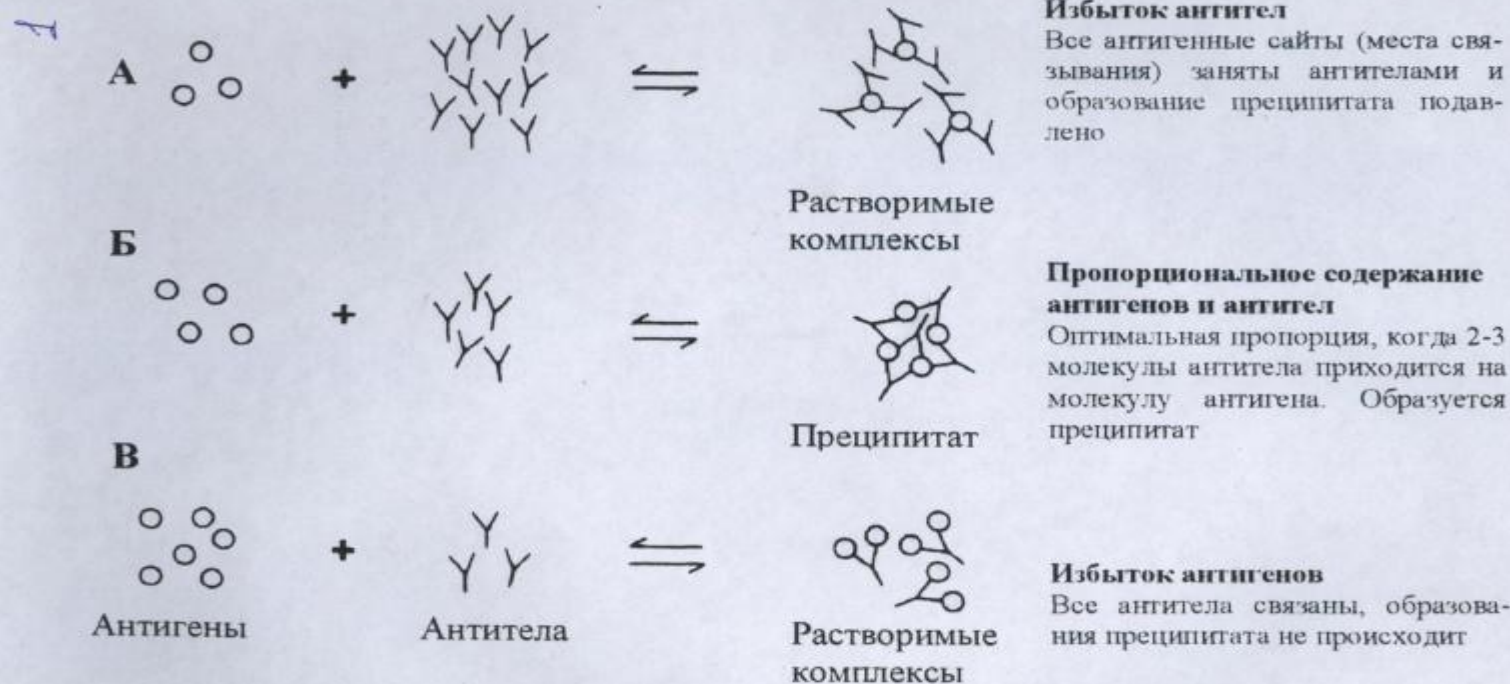
не требует специального оборудования, но он довольно длительный, не поддается автоматизации, несет определённую долю субъективизма.



Реакция между АГ и АТ в жидкой фазе.

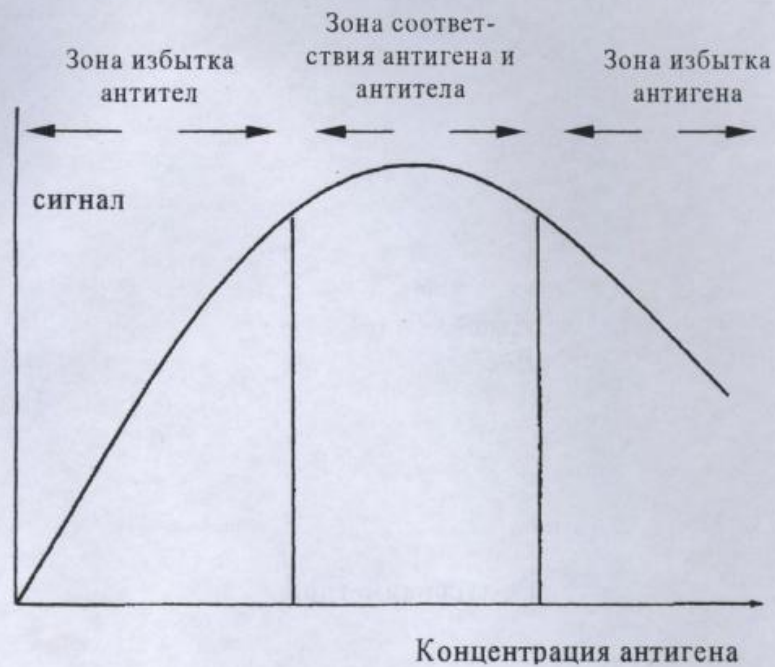
Метод турбидиметрии и нефелометрии.

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



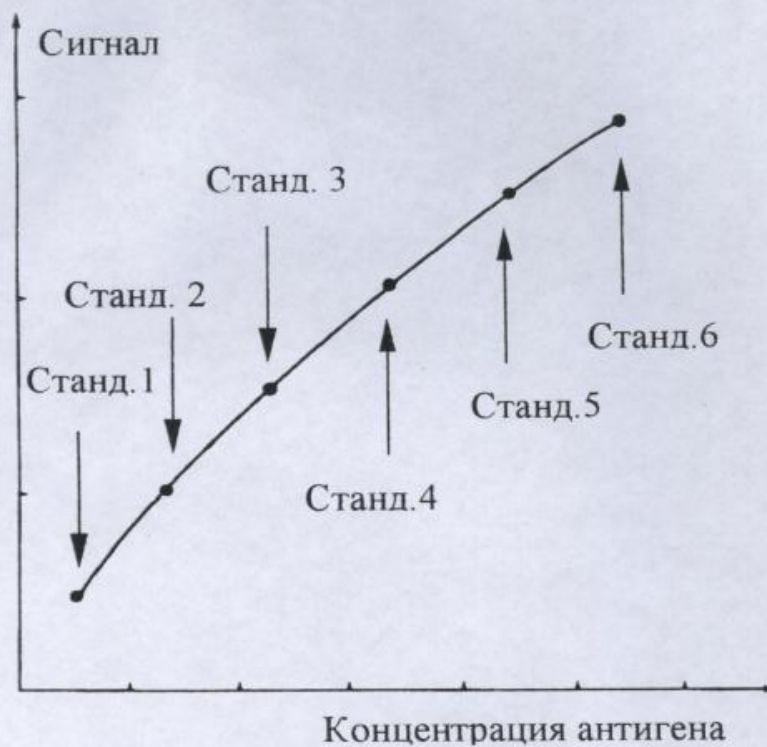
Схематическая диаграмма формирования преципитата при взаимодействии антиген-антитело.





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).



# 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

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.



# Иммунохемилюминесцентный метод



# Иммунохемилюминесцентный метод

## Смешивание и инкубация

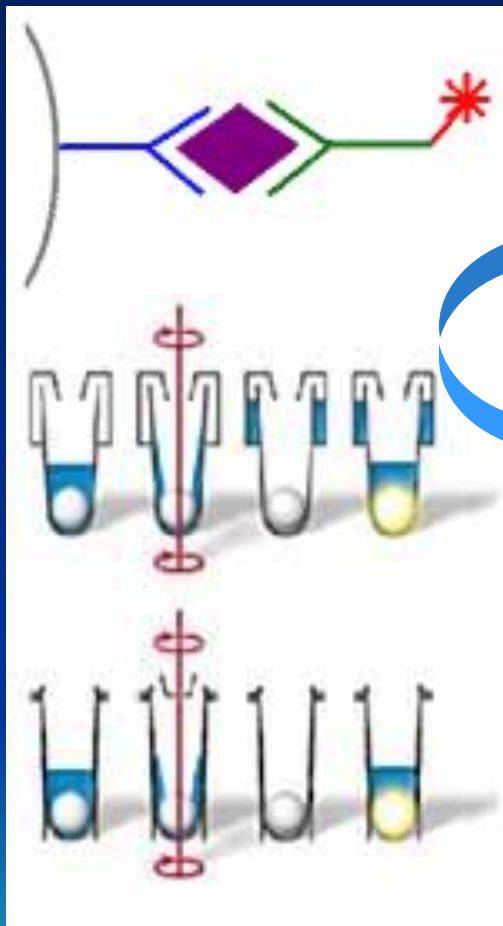
В состав входят пробирки со специальными шариками, покрытыми антителами или антигеном, которые используются в качестве твердой фазы реакции. Проба автоматически вносится в пробирку, содержащую шарик. Добавляется конъюгат, меченный ферментом щелочной фосфатазой.

### 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

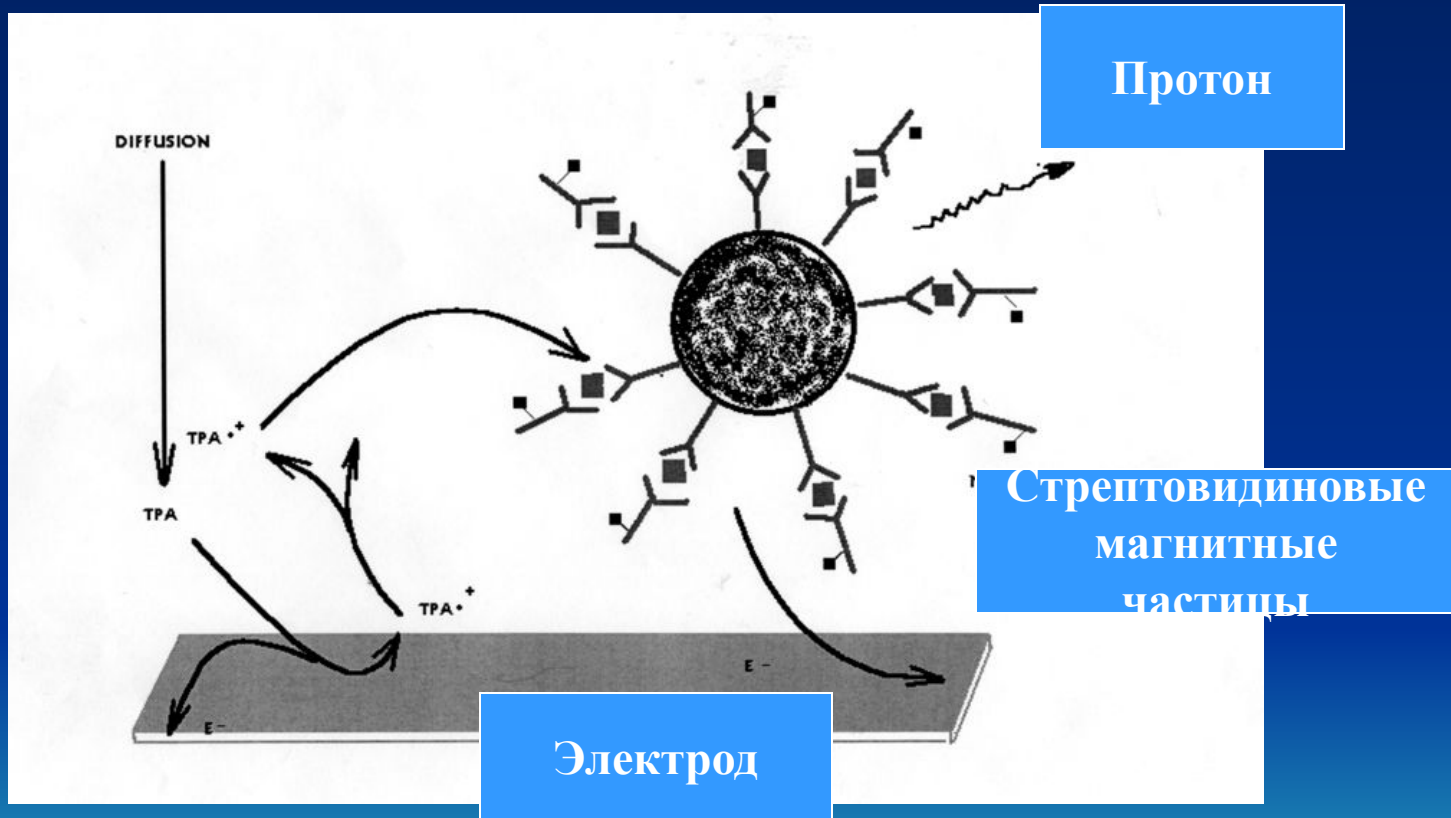
Метод основан на детекции эмиссии света, возникшей под воздействием электрического поля.

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



# Сопоставление методов применительно к гормональным исследованиям

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



# Хроматографические методы исследования

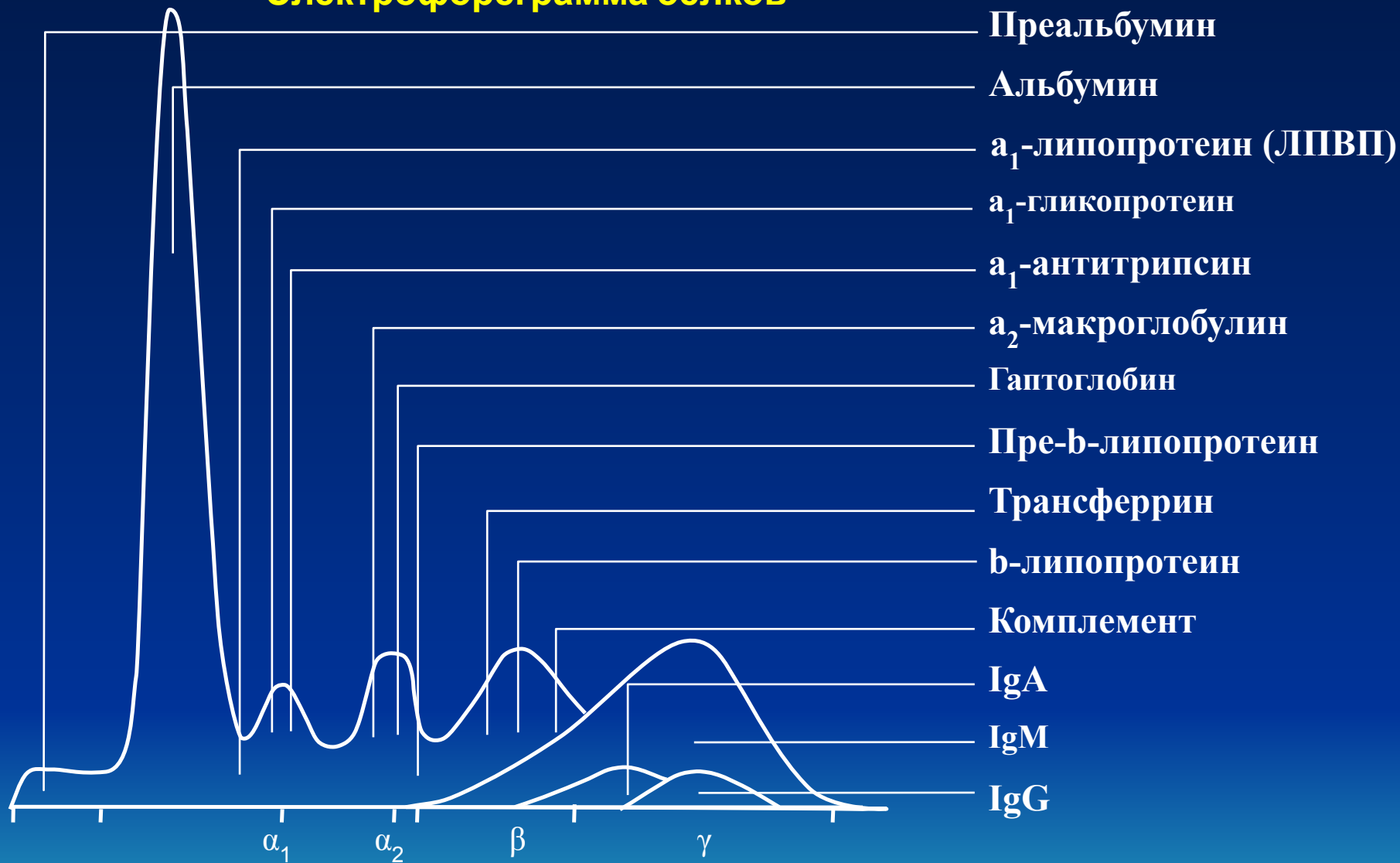
- Аффинная ЖХВД; Тонкослойная хроматография  
Техника ТСХ. Приготовление пластинок. Нанесение  
препаратов. «Проявление» пластинок, обнаружение  
пятен или полос (денситометрия).
- Метод трудоемкий, токсичный.



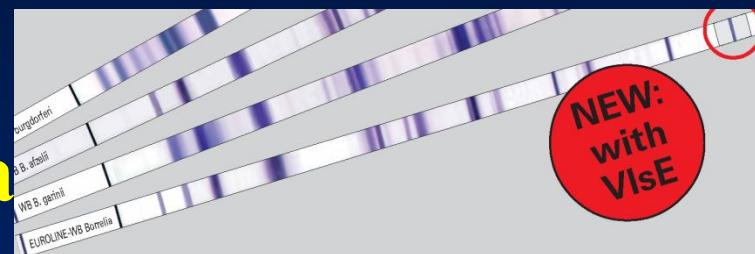
*Paragon-Appraise*



## Электрофореграмма белков



# 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;

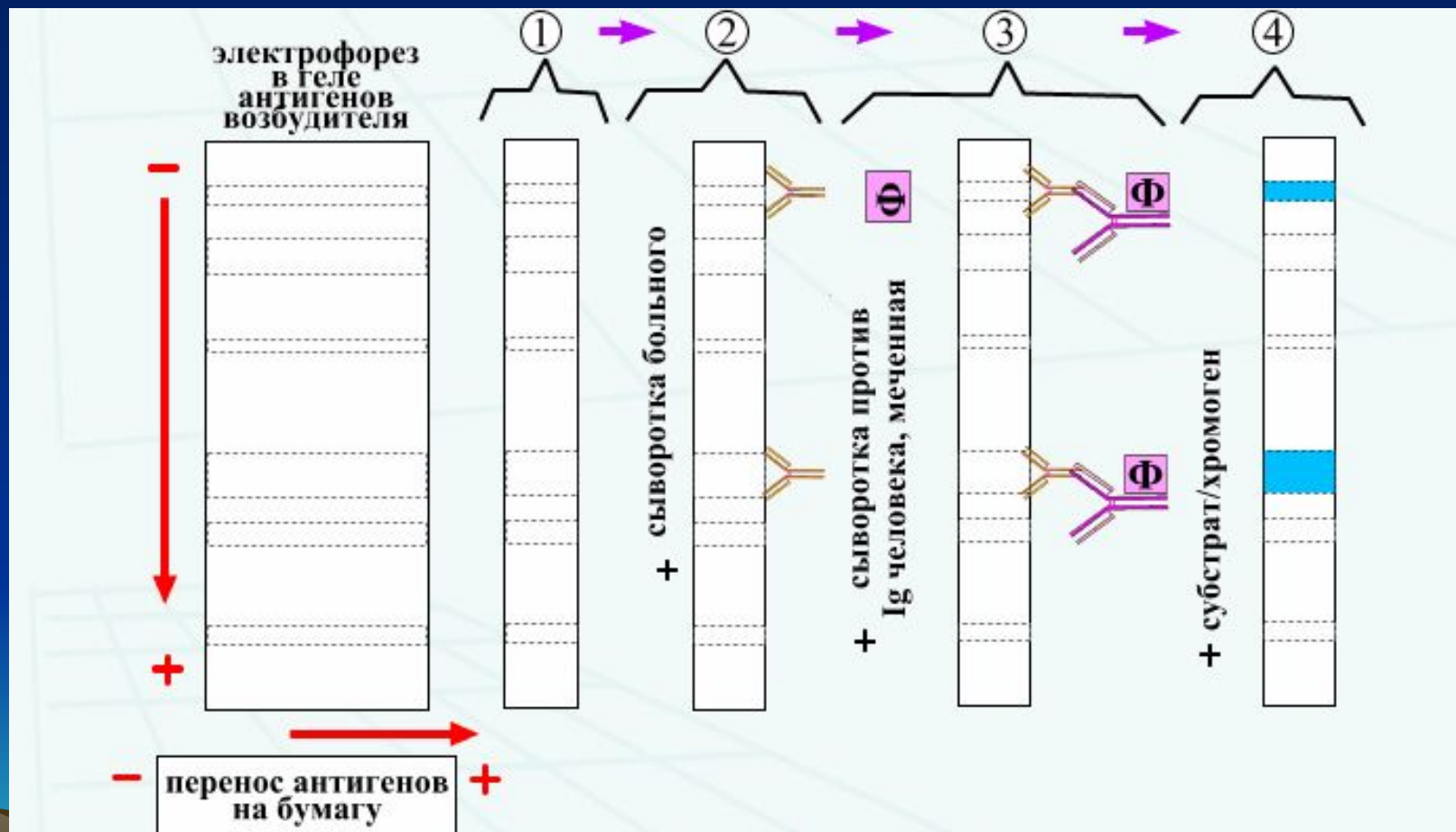


# Иммуноблоттинг

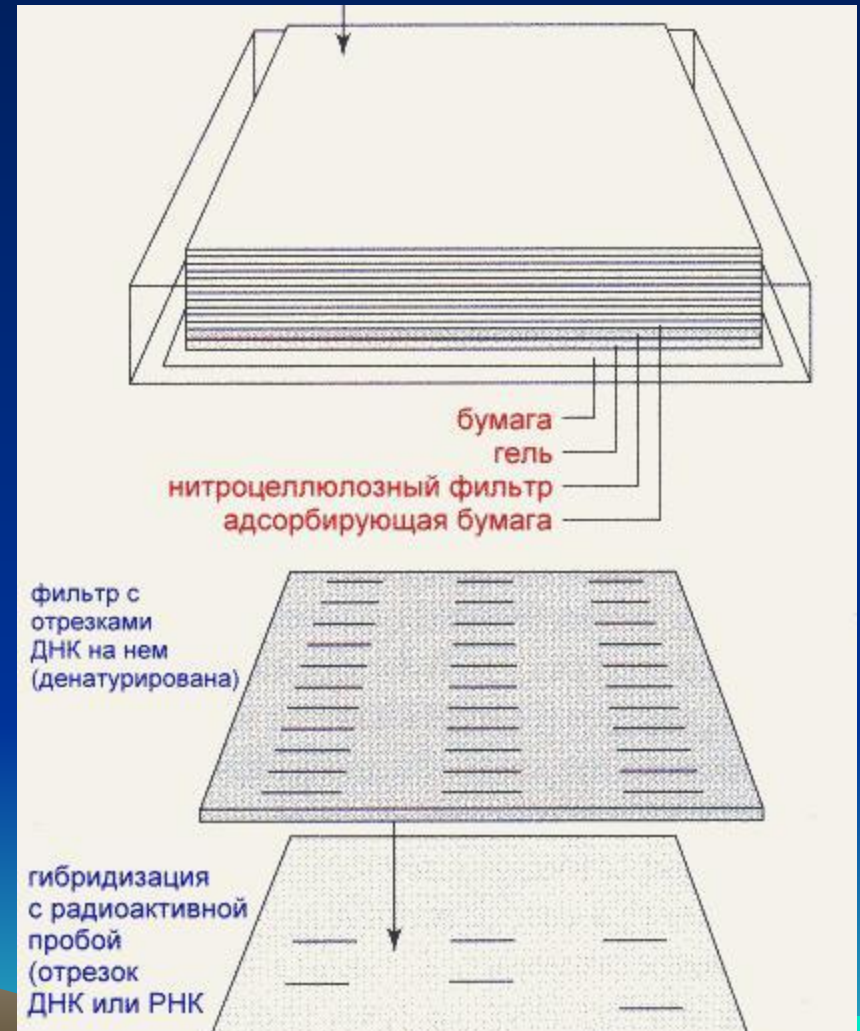
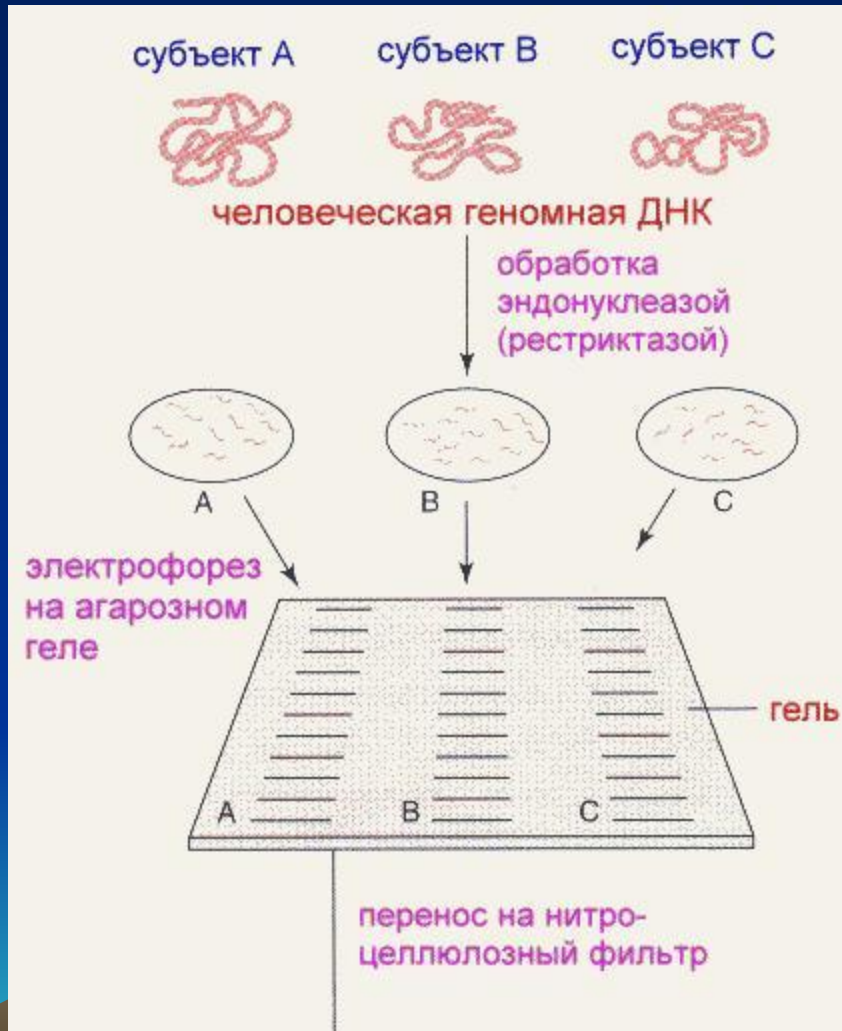
**Иммуноблоттинг (син. вестернблоттинг) - высокочувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА.**

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



# SOUTHERN, WESTERN, NORTHERN BLOTS



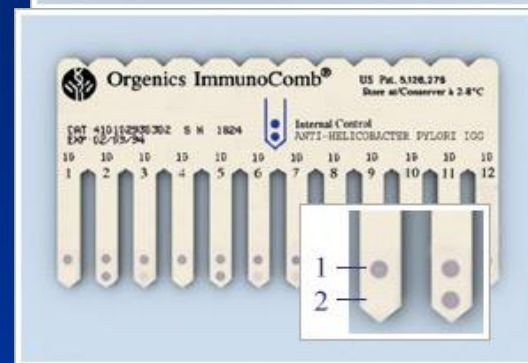
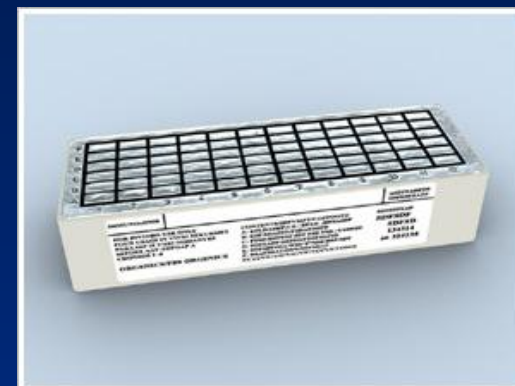
# SOUTHERN, WESTERN, NORTHERN BLOTS

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.



# IMMUNOCOMB ORGENICS

Зубцы пластикового гребня  
сенсibilизированы  
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.



ВСЛЕД ЗА ИНКУБАЦИЕЙ В РЯДАХ С, Д И Е:



1

Внесите образцы и контроли в ряд А

4

Цветная реакция в ряду F



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.



## Тестовое поле на гемоглобин в поперечном сечении

