

ЛЕКЦИЯ 2

Подготовила ассистент Садвакас А.С.

Лабораторные информационные системы

Современная клинико-диагностическая лаборатория — сложная производственная система, в которой реализуются сотни технологических процессов. Использование лабораторных информационных систем в целях создания современной технологии управления клинико-диагностической лабораторией, гарантирующей высокое качество результатов лабораторных исследований при минимальных затратах, — единственный конструктивный путь и один из ключевых инструментов, позволяющих достичь поставленной цели.

Лабораторные информационные исследования предназначены для комплексной автоматизации деятельности клинико-диагностической лабораторией, поэтому их называют системами управления лабораторной информацией.

Управление современной клинико-диагностической лабораторией предусматривает деятельность по организации непосредственно технологического процесса производства лабораторных анализов и целого комплекса других процессов, таких как материальное обеспечение, экономическая и клиническая эффективность.

Лабораторные информационные исследования состоят из технических средств (центрального процессора, устройств ввода-вывода, запоминающих устройств, интерфейсов, автоанализаторов) и программного обеспечения (компьютерных программных средств, обеспечивающих работу технических средств и обработку информации).

В функции лабораторных информационных исследований входят:

- регистрация доставленного в лабораторию биоматериала и заявок на его исследования, их распределение по частным технологическим процессам выполнения анализов, регистрация и оформление результатов исследований, оперативный и ретроспективный анализ деятельности лаборатории;
- автоматизация выполнения исследований, включая ввод и обработку данных с автоанализаторов, составление отчетов о загрузке оборудования;
- контроль качества лабораторных исследований, оперативное выявление и исправление ошибок, оценка точности и воспроизводимости аналитических результатов, их статистическая обработка и принятие решения по этим данным;
- анализ и выдача результатов исследований;
- составление различных статистических отчетов;
- предоставление информации для принятия управленческих решений по повышению качества результатов анализов;
- учет поступления и использования реактивов, расходного имущества.

Лабораторные информационные системы, которые предназначены для комплексной автоматизации деятельности клинико-диагностической лабораторией, позволяют достичь следующих преимуществ:

- оптимизации и упрощения рабочих процессов лаборатории;
- оптимизации документооборота лаборатории;
- максимально эффективного использования рабочего времени сотрудников лаборатории;
- максимально эффективного использования технической базы лаборатории (анализаторов);
- гарантирования конфиденциальности информации о результатах анализов пациентов;
- возможности эффективного и легкого масштабирования лаборатории как по спектру выполняемых исследований/так и по потоку проб без потери качества;
- улучшения и постоянного контроля качества выполняемых исследований;
- упрощения ведения коммерческой деятельности лаборатории (приема и учета частных пациентов, введения индивидуальных скидок пациентам, работы с корпоративными заказчиками);
- простоты интеграции удаленных процедурных кабинетов в единую информационную систему и т.д.

Методы видеоцифровой регистрации

Одной из очевидных тенденций модернизации лабораторной диагностики является все более широкое внедрение компьютерных и информационных технологий, в частности замена традиционных систем регистрации на комплексы, базирующиеся на подходах видеоцифровой регистрации.

Масштабному внедрению видеоцифровых систем способствуют многие факторы, среди которых постоянно улучшающиеся технические характеристики приборов получения изображений — видеокамер и сканеров, их экономическая доступность, развитие и массовое использование информационных и коммуникационных технологий.

Системы видеоцифровой регистрации дают возможность получать изображение образца, представляющее собой совокупность количественно измеряемых сигналов, отвечающих большому количеству точек — пикселей аналитического объекта (например, лунки микропланшета или иммунохроматографической тест-полоски).

При видеоцифровой регистрации на один объект приходится большое количество (от сотен до нескольких тысяч) регистрируемых цифровых характеристик, которое определяется пространственным разрешением соответствующего устройства. В случае однородных объектов при видеоцифровой регистрации эти характеристики усредняются (обычно берется не менее тысячи значений) и вычисляется оптическая плотность или коэффициент светоотражения, как и при обычной фотометрии.

Системы получения изображений аналитических объектов

В качестве аппаратной части систем видеоцифровой регистрации могут использоваться два типа устройств — цифровые видеокамеры и сканеры. Каждое из этих устройств имеет свои достоинства и недостатки.

Видеоцифровые камеры компактны, позволяют получать качественные изображения, обеспечивают высокую скорость съемки, дают возможность конструировать малогабаритные мобильные с автономным питанием и более универсальные, чем сканеры, приборы. К недостаткам систем с видеокамерами относятся небольшое поле зрения и сложность создания равномерного освещения исследуемого объекта.


Сканеры являются готовым промышленным изделием, доступны по ценам, дают изображения высокого разрешения, обладают хорошей цветопередачей. Вследствие больших размеров и требований к электропитанию их используют в основном только как стационарное оборудование. Существенным достоинством сканерных систем является возможность работы с широко распространенными лабораторными тестами, проводимыми в 96-луночных планшетах.

В практике лабораторной диагностики можно выделить два типа аналитических объектов и исследований, требующих различных подходов при регистрации прохождения реакции.

Это исследования, проводимые на тест-полосках (ИХ-тесты, тесты «сухой химии»), и исследования, проводимые в матричном формате (иммунохимические тесты в 96-луночных микропланшетах и планшетах других форматов, исследования на основе микроматриц микрочипов).

При использовании ИХ-тест-полосок результатом исследования является появление нескольких линий: контрольной, обозначающей пригодность теста, и тестовых, обозначающих наличие или отсутствие определяемого аналита.

При применении полосок «сухой химии» в ходе исследования регистрируется изменение цвета расположенных на тест-полоске реагентных зон. Для ИХ-тестов и полосок «сухой химии» аналитическими зонами (зонами интереса), в которых необходима оценка интенсивности реакций с помощью программного обеспечения, являются линии и окрашенные зоны, которые несут значимую информацию.



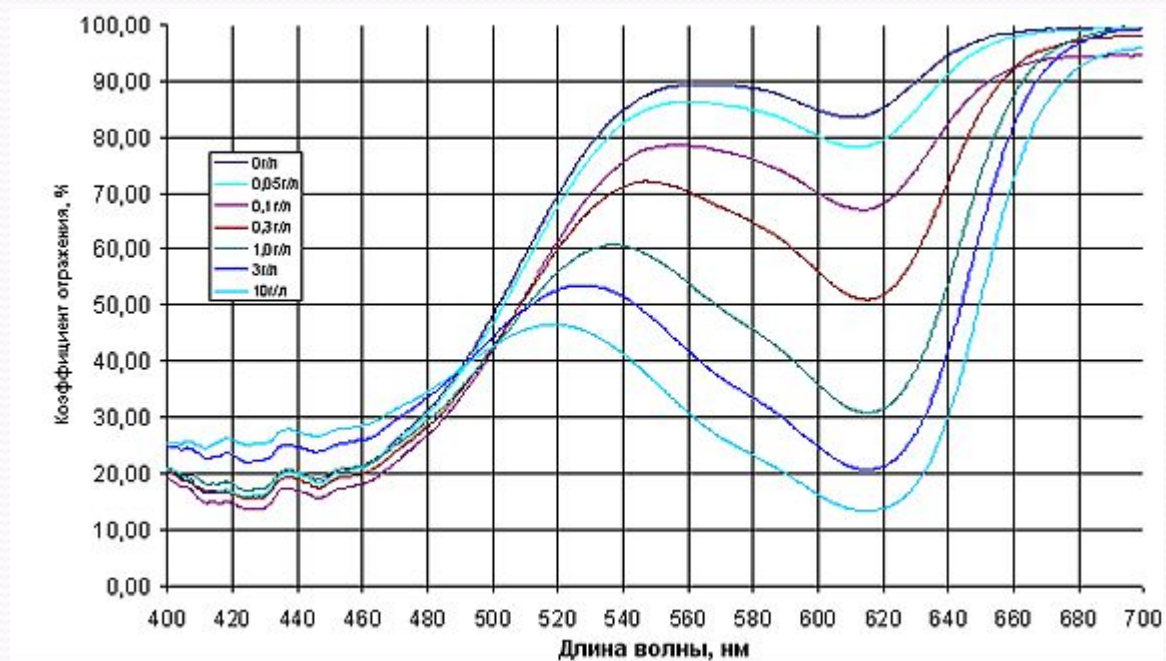
Тесты «сухой химии» для биохимического анализа крови и мочи широко используются в клинической лабораторной диагностике и являются традиционным объектом регистрирующих приборов на основе обычной рефлектометрии.

Для этих объектов видеоцифровой регистрации обладает рядом преимуществ. Каждая зона интереса и изображение каждой полоски могут обрабатываться одновременно. Это дает системам видеоцифровой регистрации преимущества перед традиционными рефлектометрическими методами, такие как сохранение первичного изображения тест-полоски; возможность работать с произвольным количеством независимых каналов регистрации, т.е. анализировать несколько полосок одновременно; применимость этого подхода к различным типам тестов в режиме конечной точки и кинетическом режиме.

Таким образом, гибкое программное обеспечение для полосок «сухой химии» обеспечивает объективную интерпретацию результатов и получение информации в виде концентраций соответствующих аналитов.



Принцип метода сухой химии с отражательной фотометрией



Спектр отражения реакционной зоны тест-полоски Урискан в зависимости от концентрации альбумина в растворе



1. Используют свежую мочу, хорошо перемешанную



2. Вынимают из тубы полоску



3. Тубу плотно закрывают. Осушитель предохраняет полоски от действия влажности воздуха



4. Полоску погружают на 2–3 с в исследуемую мочу, чтобы все тестовые зоны были смоченными



5. Вынимают полоску и проводят о край емкости для удаления избытка мочи, не касаясь зонами индикации



6. Оценка проводят после указанного в инструкции времени, сравнивая окраску зон с цветной шкалой на этикетке

Рис. 6. Порядок исследования мочи с использованием диагностических полосок ФАН

СКАНЕРНАЯ ВИДЕОЦИФРОВАЯ СИСТЕМА ДЛЯ 96-ЛУНОЧНОГО ПЛАНШЕТА

Для оценки иммунохимических реакций (реакции «антиген-антитело» или более широко — реакции специфического связывания) разработаны и используются специализированные аналитические технологии, которые условно можно разделить на три группы.

1. Прямые (непосредственные) методы определения реакции «антиген-антитело». Образующийся при этом комплекс «антиген-антитело» идентифицируется визуально либо с помощью простых оптических устройств. К таким методам относятся преципитация в растворе (в том числе реакции турбидиметрии и нефелометрии), в геле, на полимерной пленке, агглютинация бактериальных клеток, простейших, прямая реакция агглютинации эритроцитов антителами, вирусами.
2. Реакции агглютинации частиц, с поверхностью которых связаны антигены или антитела. К этим методам относятся реакции прямой гемагглютинации и непрямой гемагглютинации, латекс-агглютинации, коагглютинации, агглютинации частиц бентонита, желатиновых капсул, частиц сефарозы и др. Метод регистрации чаще всего визуальный.
3. Индикаторные методы, основанные на использовании различного рода меток для выявления реакции «антиген-антитело». Наиболее распространены иммуноферментный, иммунофлюоресцентный, радиоиммунологический анализы. Тип регистрирующего устройства определяется используемой меткой.

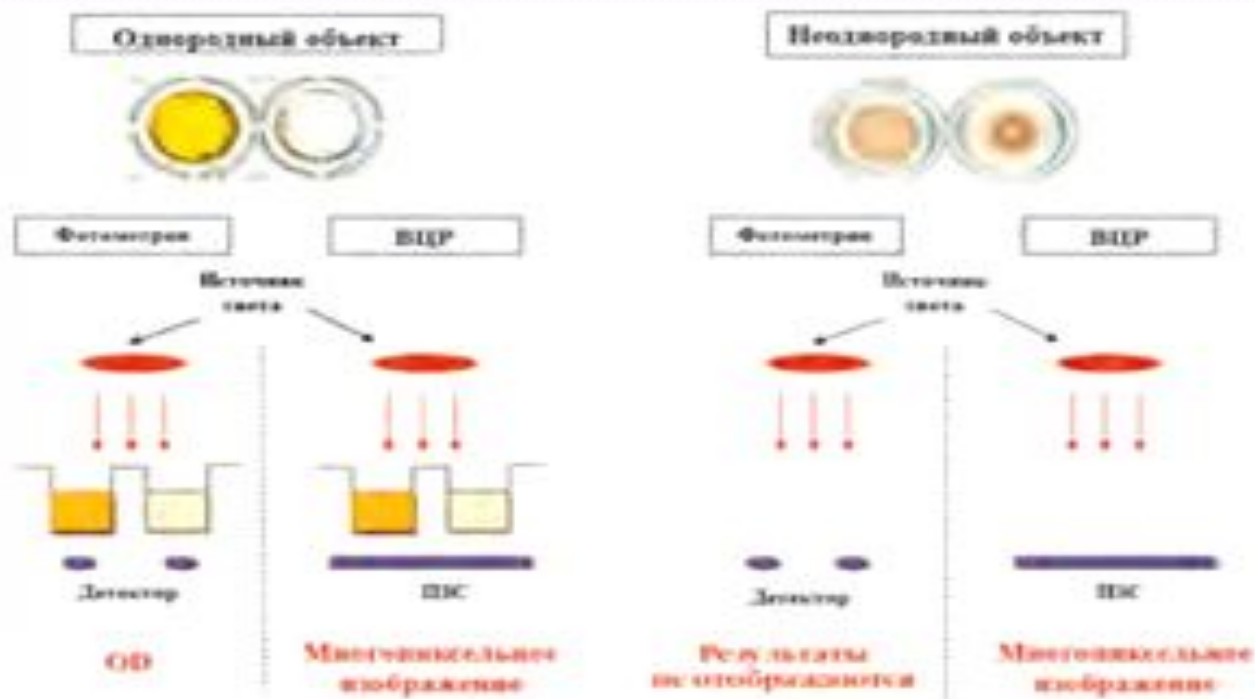


Рис. 1. Сравнение возможностей фотометрии и ВЦР при работе с однородными и неоднородными лабораторными объектами

Программное обеспечение для всех этих методов построено по единому принципу и обеспечивает:

- получение и архивирование первичного изображения;
- различные алгоритмы визуализации полученных данных программными методами — увеличение исследуемого изображения (инструмент «лупа»), контрастирование, инвертирование (обращение цветов для лучшей идентификации агглютинации), сопоставление увеличенных изображений положительных и отрицательных образцов;
- объективизацию результатов за счет использования программных методов математической обработки изображения и возможность автоматической интерпретации результатов;
- унифицированный интерфейс модульных программ, что облегчает освоение и рутинное использование всех разнообразных возможностей системы;
- возможность подключения комплекса к лабораторной информационной системе с автоматической передачей данных согласно коду пробы пациента, что значительно снижает количество ошибок, связанных с неправильной идентификацией образца при выдаче результата.

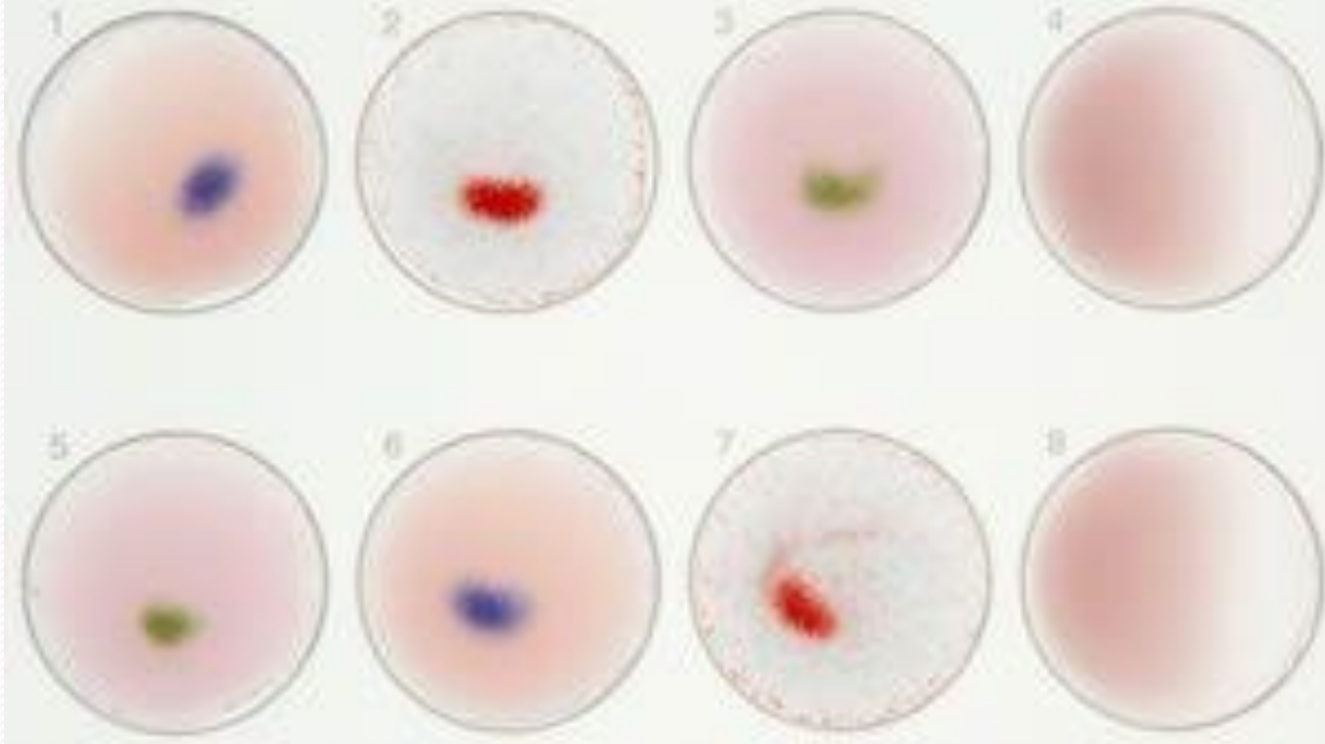
ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ ВИДЕОЦИФРОВОЙ РЕГИСТРАЦИИ ДЛЯ ОБЪЕКТИВИЗАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИОННЫХ ТЕСТОВ

Диагностические системы на основе латекс-агглютинации широко распространены в лабораторной диагностике благодаря простоте и скорости проведения анализа.

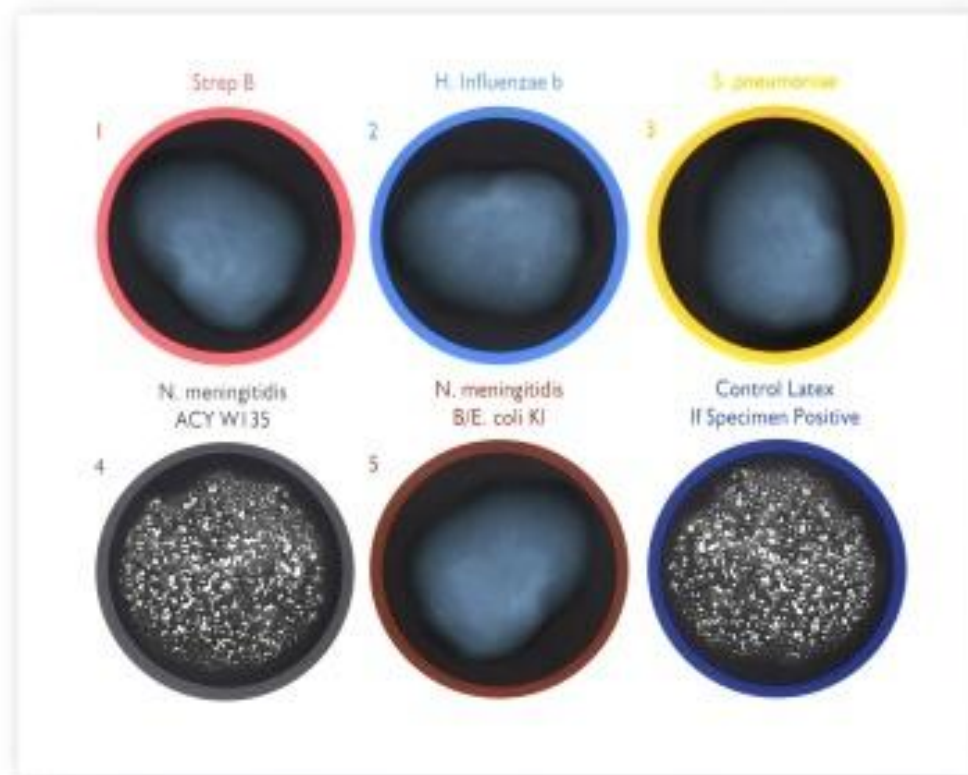
Разработаны методы получения латексных частиц различного состава, размеров, цвета и свойств, а также способы сенсibilизации латексов разнообразными антигенами и антителами, что позволяет сконструировать практически любой диагностикум.

Биологическая инертность латекса позволяет снизить возможность перекрестных неспецифических реакций, а также обеспечивает длительную сохранность готовых реагентов. Однако латексные тесты имеют ряд существенных недостатков, обусловленных быстрым протеканием и нестабильностью результатов реакции во времени. Необходимость визуальной регистрации результатов через строго определенное время, часто составляющее не более 2-3 мин, приводит к субъективности оценки результатов. Эти факторы ограничивают ценность и сужают область применения латексных тестов.


Remel



Быстрый латексный агглютинационный тест для выявления и предварительного определения серогруппы *Salmonella* с селенитового бульона и/или плотной среды.



Набор Wellcogen на менингококковые инфекции/Wellcogen Bacterial Antigen Kit



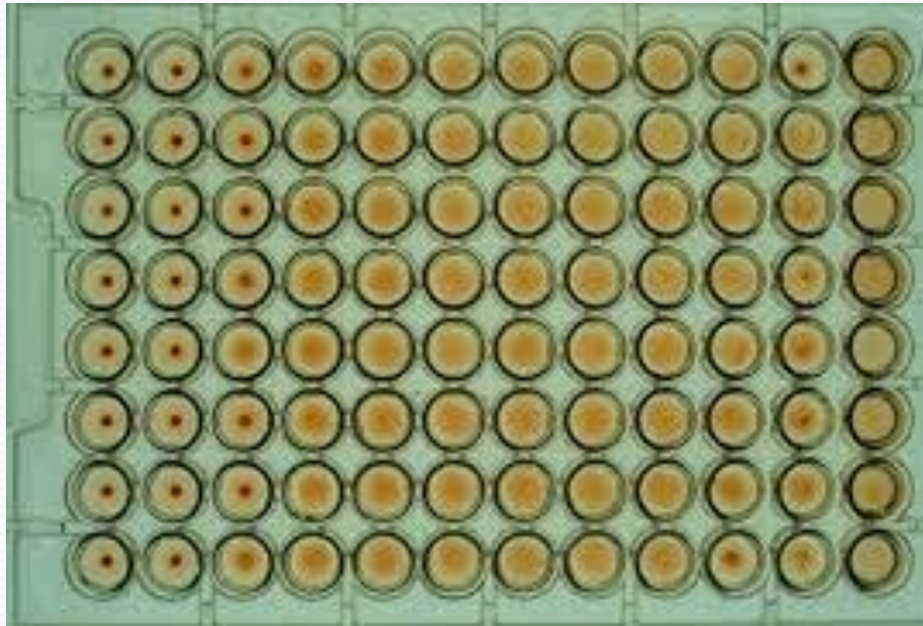
Информация о наличии или отсутствии агглютинации для конкретного образца с помощью системы видеоцифровой регистрации фиксируется в строго определенное, соответствующее инструкции время и представляется и сопоставляется многократно в различных видах:

- сопоставление контрастированных и увеличенных изображений образцов и контролей;
- оценка визуального представления расчетного количества конгломератов;
- численные расчетные значения интенсивности агглютинации;
- дискриминация положительных и отрицательных образцов на основе расчета порогового значения.

РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ С ВИДЕОЦИФРОВОЙ РЕГИСТРАЦИЕЙ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реакция пассивной гемагглютинации широко используется в серодиагностике, по чувствительности этот метод сопоставим с иммуноферментным анализом. Хотя существуют наборы реакции пассивной гемагглютинации различной специфичности (для определения антител к возбудителю кори, иерсиниоза, бруцеллеза и некоторых других инфекций), однако наибольшее распространение имеют системы определения антител к *Treponema pallidum* для серодиагностики сифилиса, используемые многими лабораториями как основной тест.

Эти системы, как и другие наборы реакции пассивной гемагглютинации, предполагают визуальный учет результатов, что является их существенным недостатком.



MedUniver.com - все по **медицине**

Agglutination of Ag-loaded test erythrocytes in the presence of specific antibodies in patient serum

1. Hemagglutination



а)



б)



в)

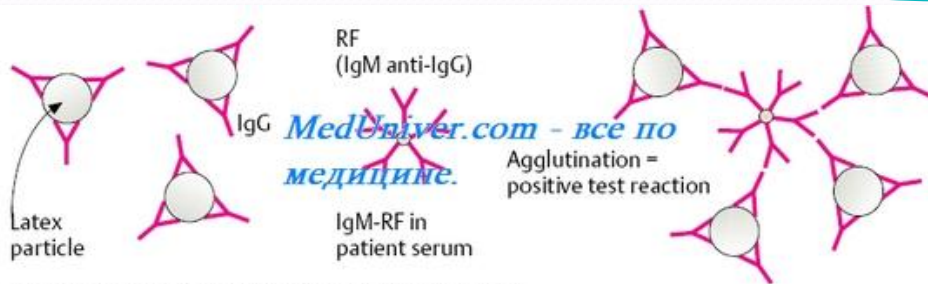
Рис. 2. Варианты видеоцифровых регистрирующих устройств.
а) Анализаторы "Рефлексом". б) АПК на основе анализатора "Рефлексом".
в) АПК "Эксперт-Лаб"

Автоматизированный учет результатов диагностики сифилитической инфекции методом реакции пассивной гемагглютинации обеспечивает повышение диагностической специфичности и чувствительности, позволяет исключить субъективный подход к интерпретации результатов.

Реакция пассивной гемагглютинации основана на регистрации формирования агрегатов сенсibilизированных эритроцитов («зонтика») в лунках круглодонного планшета при наличии в сыворотке пациента специфических антител.

Исследование проводят согласно инструкции производителя эритроцитарного диагностикума. Для получения воспроизводимых результатов необходимо учитывать результаты реакции через строго заданное время инкубации (для реакции пассивной гемагглютинации при определении антител к *Tr. pallidum* оптимально - 1 ч).

Так же как и для латексных тестов, наличие численной характеристики выраженности агглютинации позволяет определить воспроизводимость тестирования и на основании рассчитанных целевых значений проводить внутрилабораторный контроль качества. Существуют разновидности реакции пассивной агглютинации, где вместо эритроцитов используются искусственно созданные желатиновые частицы с сорбированным на них соответствующим антигеном/антителом. Предложенный алгоритм оценки интенсивности гемагглютинации (образование «зонтика») может быть использован и для регистрации результатов других лабораторных методов, где в качестве индикаторных частиц используют эритроциты, например реакции торможения агглютинации (иначе — реакции нейтрализации вирусов).



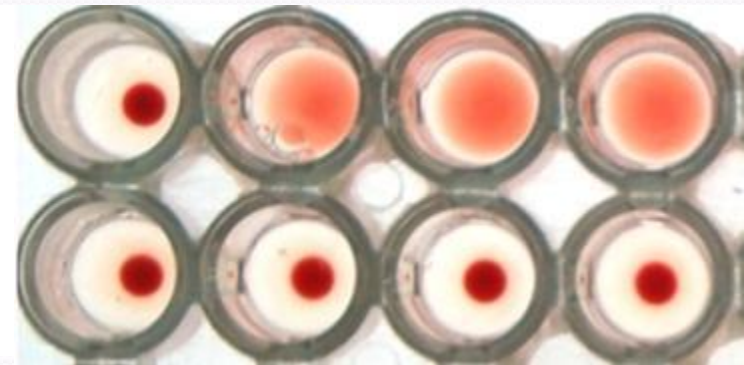
2. Latex agglutination in rheumatoid factor screening
 A. Agglutination techniques

Результат РНГА (РПГА)



Положительный («зонтик»)

Отрицательный («пуговка»)



Разведения сыворотки крови

1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 Контроль



агглютинация

нет агглютинации

К недостаткам агглютинации на плоскости следует отнести невозможность определения слабых антигенов эритроцитов и низких титров гемагглютининов в сыворотке пациента; для некоторых исследований используют пробирочный метод и практически никогда — микропланшетную технологию. Во многом это связано со сложностью визуальной интерпретации агглютинации в этом формате, отсутствием специальных сканирующих устройств, более длительным временем проведения исследования, необходимостью предварительной обработки эритроцитов для приготовления суспензии.

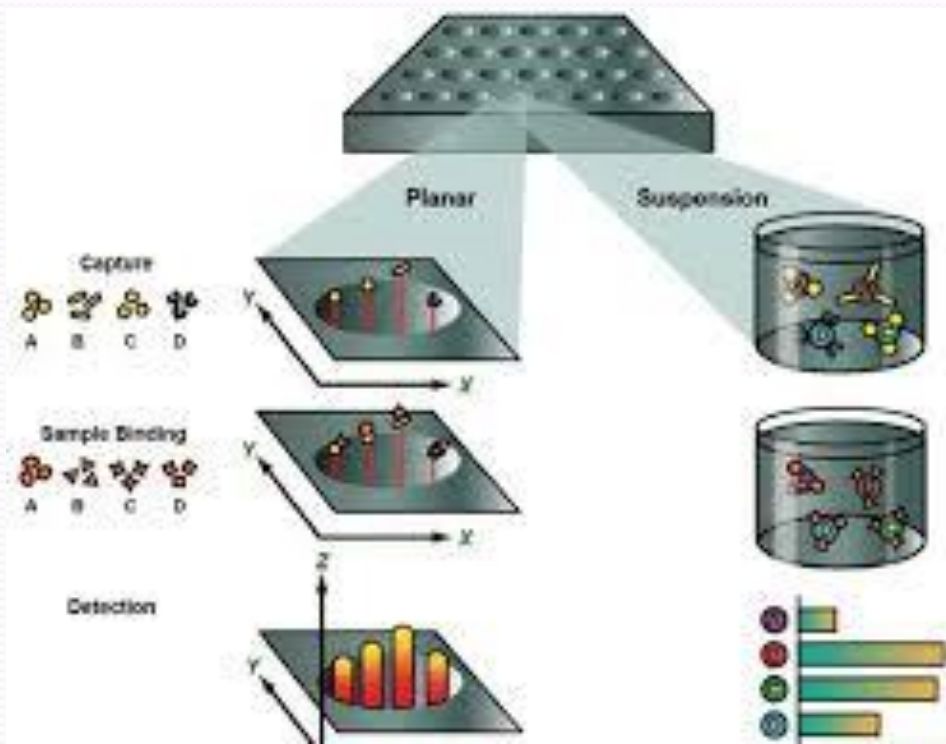
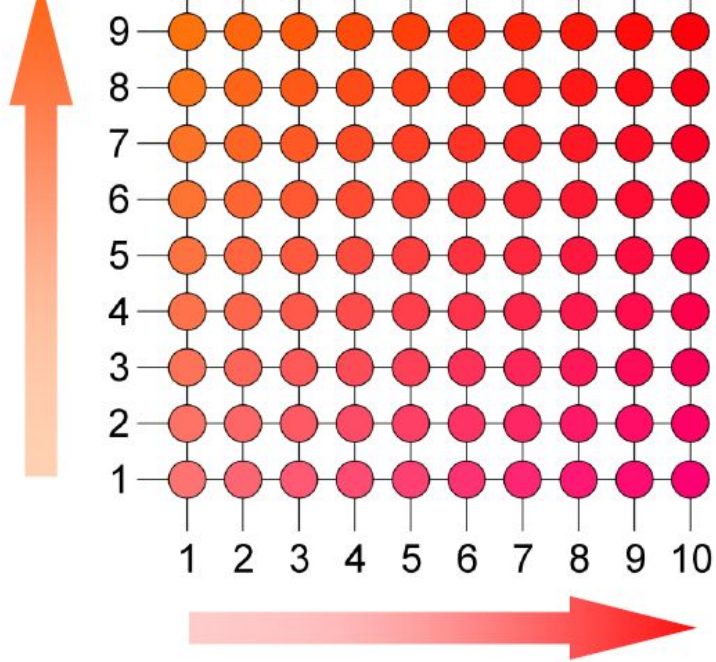
В то же время микропланшетная технология имеет следующие преимущества:

- использование малых количеств антисывороток и эритроцитов;
- проведение серийных исследований;
- сокращение времени проведения исследования за счет предварительного внесения реагентов в плашку;
- уменьшение ошибок благодаря внедрению регистрирующих устройств.

МЕТОДИКИ ИЗОСЕРОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ФОРМАТЕ 96-ЛУНОЧНОГО ПЛАНШЕТА

В случае изосерологических анализов (определения группы крови) регистрируется агглютинация эритроцитов крови пациента в присутствии специфических антител, причем для каждого образца ставится несколько реакций с антителами к групповым антигенам А и В, резус-фактору.

Изосерологические исследования остаются одной из самых консервативных технологий в клинической лабораторной аналитике, что обусловлено их высокой значимостью. До сих пор нет однозначного решения вопросов визуализации и документирования этих тестов. По-прежнему самыми распространенными способами проведения этих исследований в нашей стране остаются ручные методы. Их известно три: 1 — на плоскости, 2 — в пробирках, 3 - в планшетах для микротитрования.



По результатам исследований оптимальным следует признать алгоритм проведения изосерологических исследований по системе АВО и Rh в микропланшете с видеоцифровой регистрацией. Описан вариант постановки, включающий типирование перекрестным методом (со стандартными эритроцитами).

- Вносят в соответствующие лунки стандартные эритроциты O, A₁ и B приблизительно по 5-10 мкл и цоликлоны анти-A, анти-B, анти-D-супер, физраствор по 150 мкл.
- Вносят соответственно по 150 мкл исследуемой сыворотки и по 5-10 мкл исследуемой цельной крови.
- Инкубируют при комнатной температуре на шейкере в течение 5-10 мин. Агглютинация эритроцитов с цоликлонами обычно наступает в первые несколько минут. Но считывание следует повторить через 15-20 мин ввиду более позднего появления агглютинации с эритроцитами, содержащими слабые разновидности антигенов A или B. Агглютинация сыворотки со стандартными эритроцитами может наступить поздно в связи с возможностью низкого титра содержащихся в исследуемой сыворотке агглютининов.
- Сканируют планшет.
- В случае несовпадения определения групп крови с помощью цоликлонов и стандартных эритроцитов повторяют процедуру сканирования через 20 мин для выявления слабых антител и антигенов.

ПРИМЕНЕНИЕ СКАНЕРНОЙ СИСТЕМЫ ВИДЕОЦИФРОВОЙ РЕГИСТРАЦИИ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Коммерчески доступный сканер может быть использован в качестве вертикального фотометра 96-луночных микропланшетов для иммуноферментного анализа. Большинство используемых в настоящее время тест-систем в качестве ферментной метки имеют пероксидазу хрена, субстрат — раствор 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида, содержащий перекись водорода. Образующиеся окрашенные продукты в кислой среде имеют максимальное поглощение при 450 нм.

Иммуноферментные исследования проводят согласно инструкциям производителя. Программное обеспечение универсально и позволяет настраивать систему регистрации и дискриминации результатов в соответствии с любыми требованиями методик. Обеспечиваются варианты в режимах измерений оптической плотности, дискриминации по уровню «cut-off», рассчитываемому по различным формулам, количественных измерений по калибровочной кривой.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ СИСТЕМ ВЦР ДЛЯ КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Видеоцифровая регистрация благодаря гибкости подходов при разработке регистрирующих систем, единым принципам построения программного обеспечения для объектов различных форматов позволяет решать практически любые задачи лабораторной диагностики.

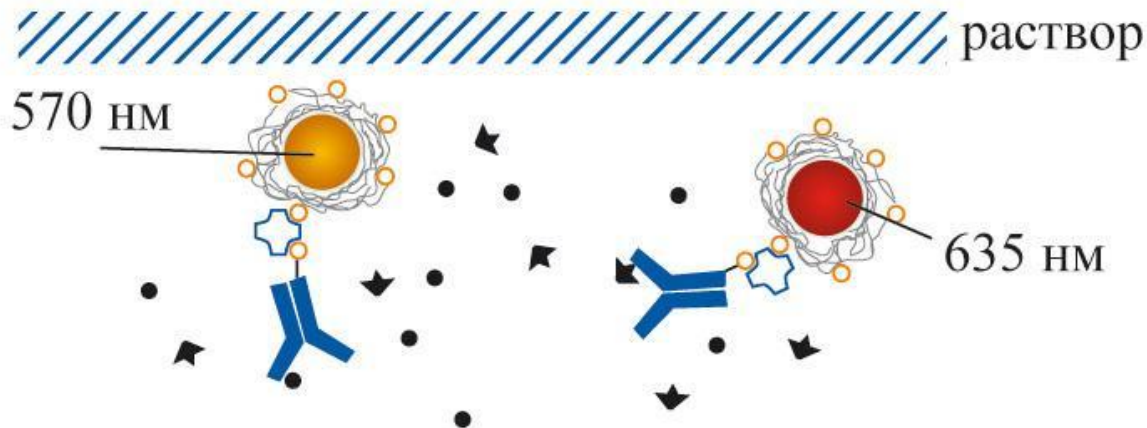
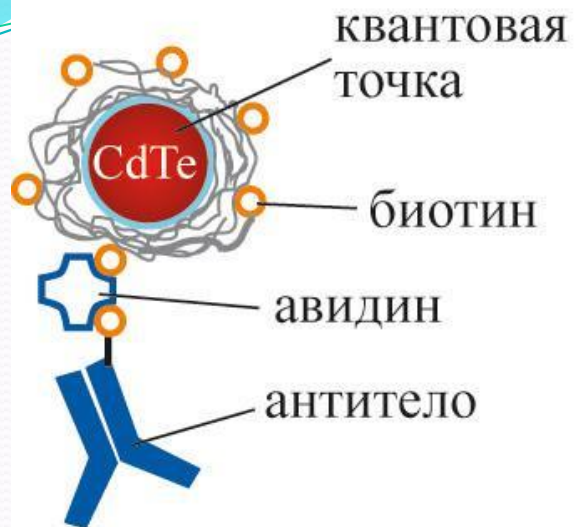
Для сканерных систем дальнейшее развитие состоит в увеличении разнообразия проводимых исследований в 96-луночных планшетах. Это иммунотурбидиметрические и биохимические исследования с вертикальной фотометрией, микробиологические тесты.

Также будут развиваться уже используемые варианты цифровой регистрации разнообразных исследований на тест-полосках в формате иммуноблота: например, Вестерн-блот или Лайн-блот (с нанесением реагентов в виде полос).

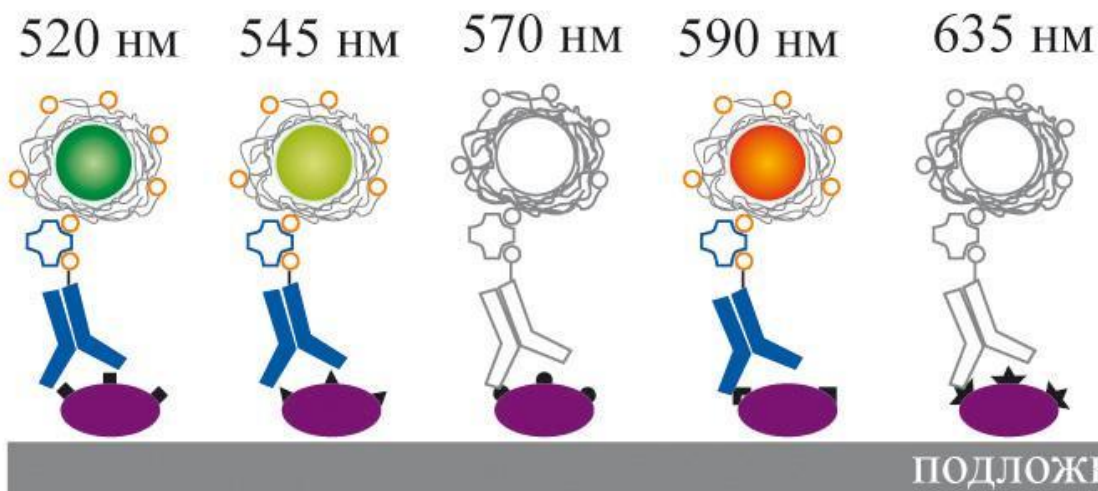
Иммунохимические методы анализа, основанные на специфическом связывании определяемого соединения соответствующими антителами, широко вошли в аналитическую практику и используются в различных областях медицины. Индикация образующегося комплекса «антиген-антитело» может быть осуществлена, если в один из исходных компонентов реакционной системы ввести метку, которая легко детектируется соответствующим высокочувствительным физико-химическим методом.

Удобными для этой цели оказались изотопные, ферментные, флюоресцентные, парамагнитные и другие метки, использование которых дало возможность увеличить чувствительность классических иммунохимических методов анализа в миллионы раз. Иммунохимические методы анализа можно использовать в диагностике заболеваний сердечно-сосудистой, эндокринной и других систем, для установления причин бесплодия, нарушения развития плода, в онкологии — для определения маркеров опухолей и контроля за эффективностью лечения, для определения концентрации в крови иммуноглобулинов, ферментов и лекарственных веществ.

В ряде случаев исследования выполняют на фоне нагрузочных функциональных проб (например, определение содержания инсулина в сыворотке крови на фоне пробы на толерантность к глюкозе) либо в динамике (например, определение в крови половых гормонов на протяжении менструального цикла).




- DEX
 - ▲ GM
 - CZP
 - ▲ MPA
 - ▼ CEF
- определенные антигены



Иммуноферментный метод

Иммуноферментный анализ — вид иммунохимического анализа, основанный на высокоспецифической иммунологической реакции антигена с соответствующим антителом с образованием иммунного комплекса, для выявления которого используют в качестве метки фермент или фермент зависимое вещество.

В основе метода иммуноферментного анализа лежит оценка результатов иммунной реакции антигена с антителом. Полученный комплекс определяется следующим образом: в реакционную смесь вводят конъюгат, который включает ферментную метку, а также добавляют специальный хромогенный субстрат. Фермент, взаимодействуя с субстратом, изменяет его окраску. Учет результатов проводят фотометрически.



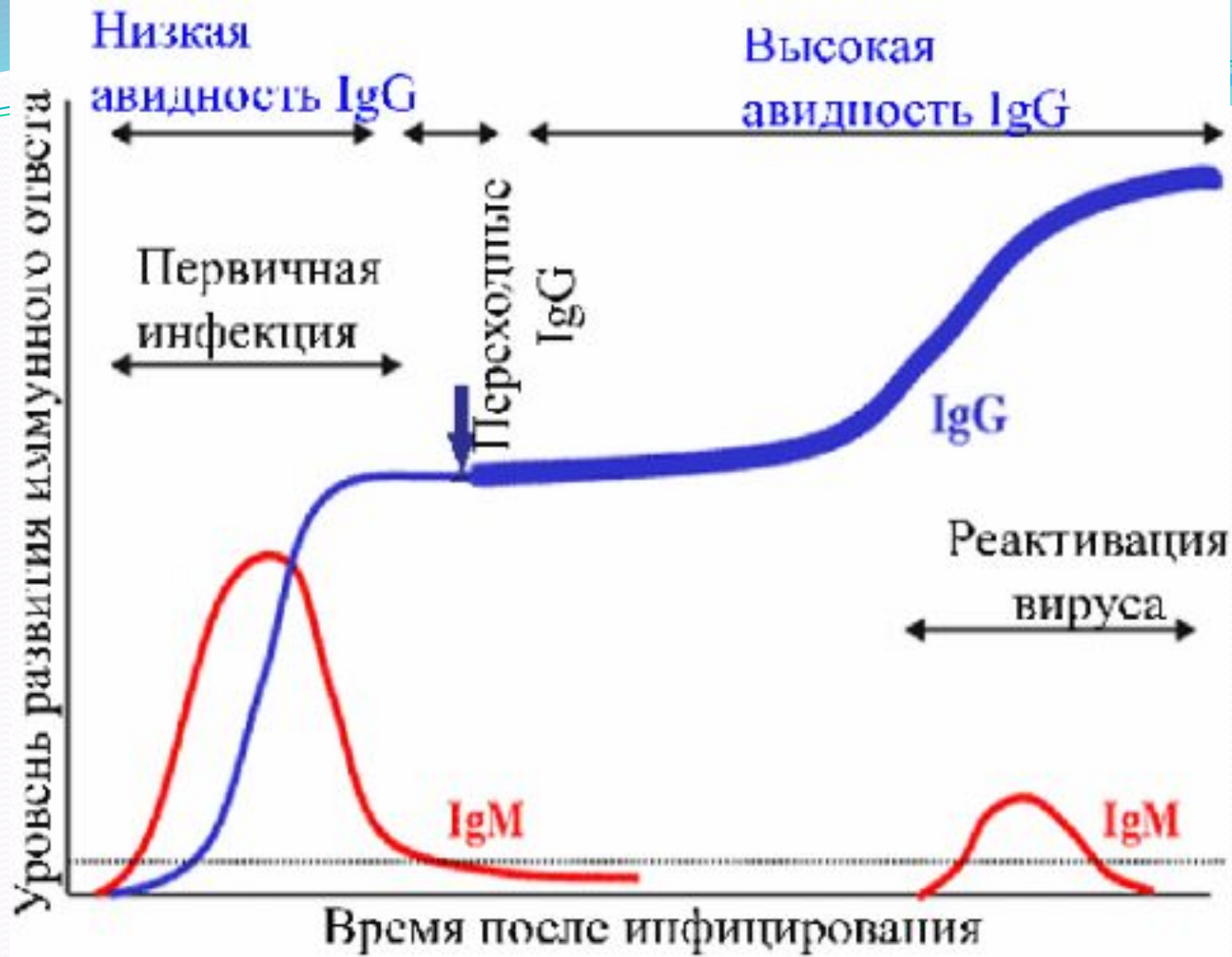
В основе метода иммуноферментного анализа лежит оценка результатов иммунной реакции антигена с антителом.

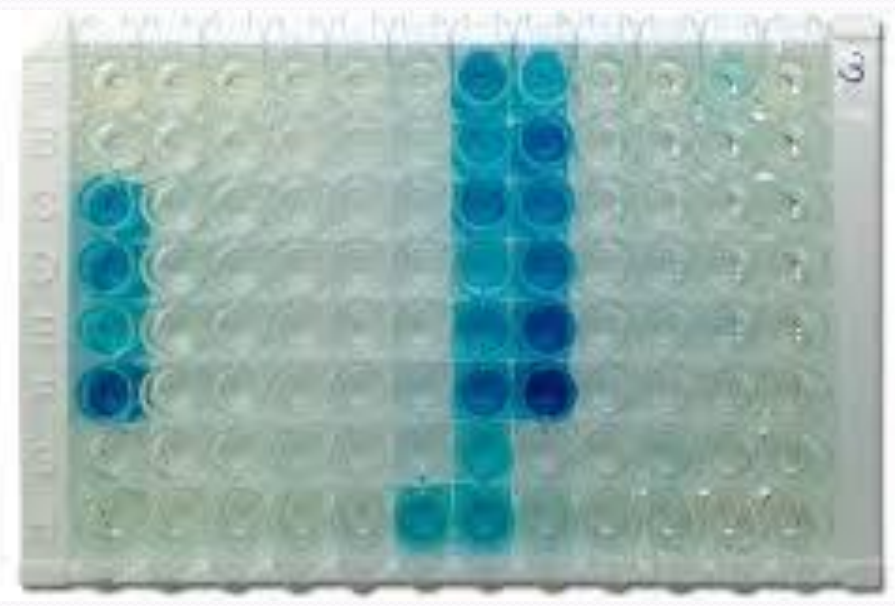
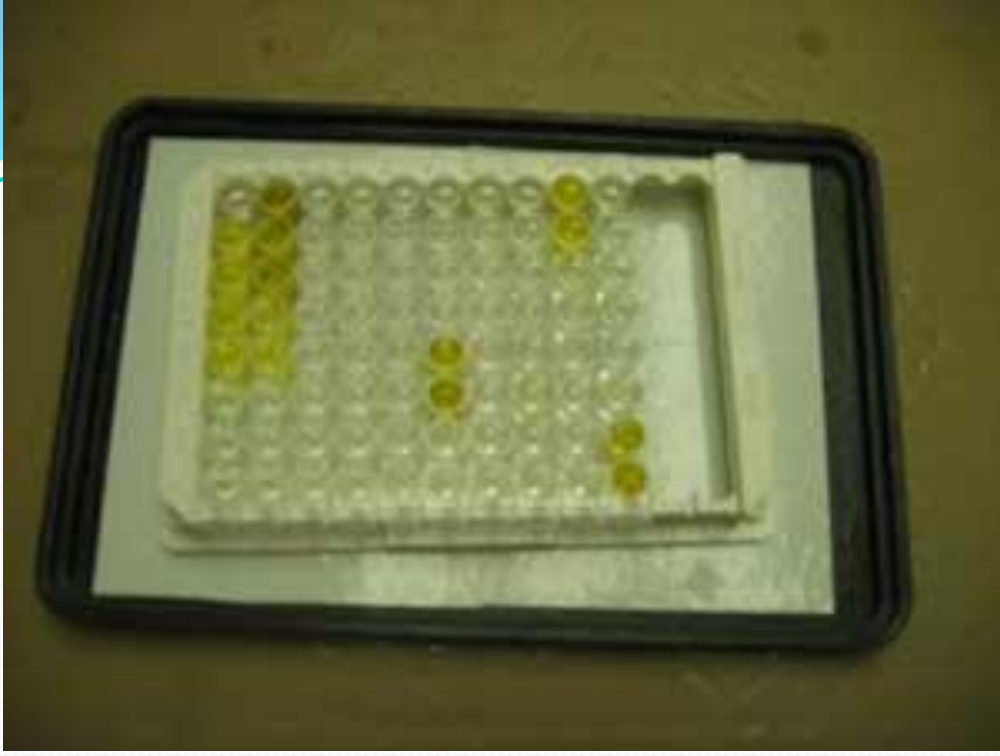
Полученный комплекс определяется следующим образом: в реакционную смесь вводят конъюгат, который включает ферментную метку, а также добавляют специальный хромогенный субстрат. Фермент, взаимодействуя с субстратом, изменяет его окраску. Учет результатов проводят фотометрически.

СТАНДАРТНАЯ КОМПЛЕКТАЦИЯ ИФА-НАБОРА

ИФА-набор, как правило, включает все необходимые для анализа реагенты, обычно на 96 определений. В набор, как правило, входят следующие реагенты.

- Стандарты (если это набор для количественного иммуноферментного анализа), 5-7 растворов с различными концентрациями определяемого аналита.
- Конъюгат (готовый раствор или концентрат), содержащий антитела или антиген с ферментной меткой.
- 96-луночный микропланшет с иммуносорбентом, упакованный в алюминиевую фольгу с осушителем.
- Концентрат промывочного буфера.
- Субстратно-хромогенный реактив — монореагент или состоящий из двух компонентов: раствора А, обычно содержащего тетраметилбензидин в буфере, и раствора В — перекиси водорода в буфере.
- Стоп-раствор, чаще всего это раствор соляной кислоты.
- Контрольная сыворотка (одна или несколько). В некоторые наборы реагентов контрольные сыворотки не входят, их заказывают отдельно. В набор могут дополнительно входить реагенты для разведения образцов, конъюгата, субстрата, стандарта.



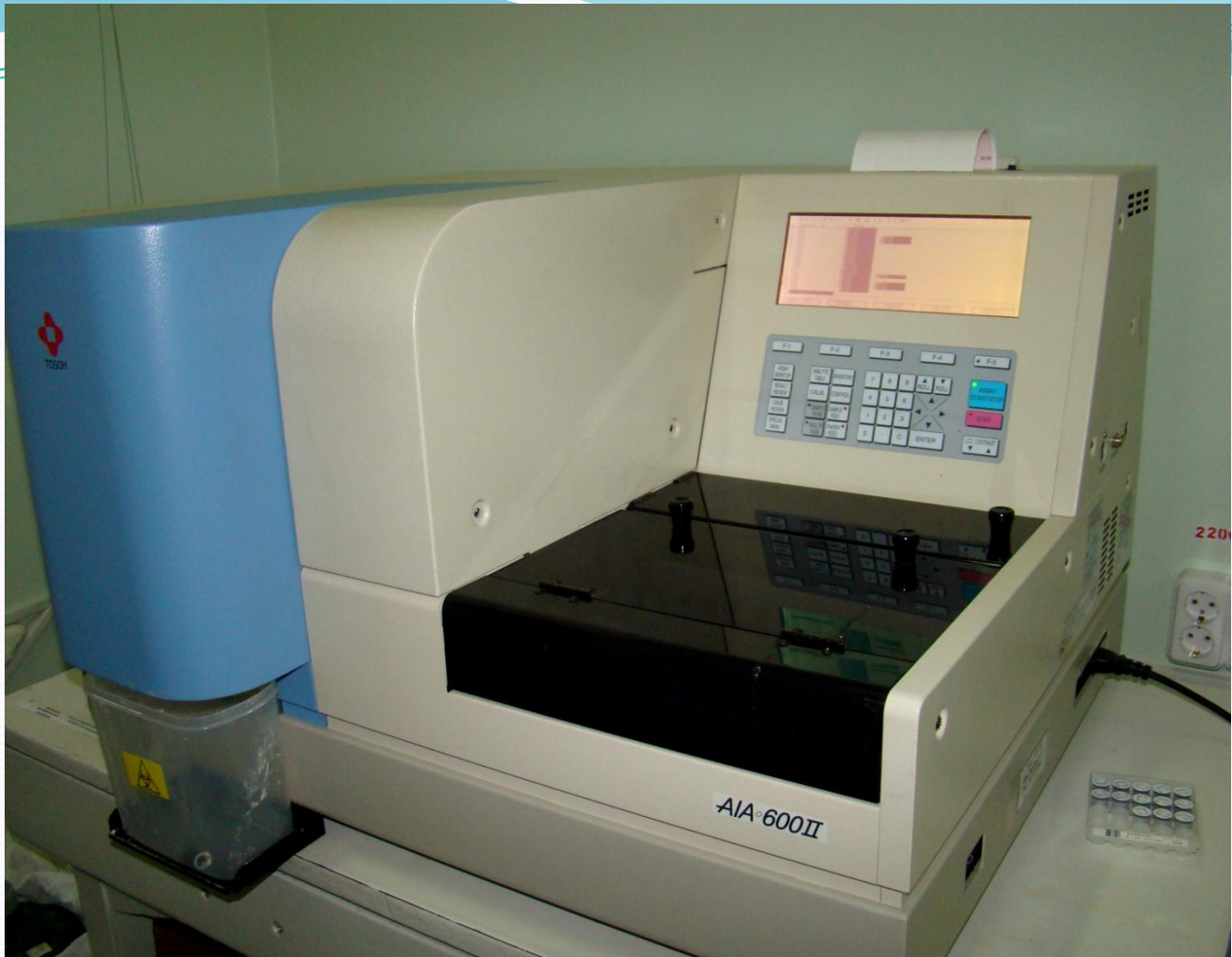


Бруцелла Род. sp.	РЕЗУЛЬТАТ			
	ОП _к			
	ОП _р			
Листерия <i>L. monocytogenes</i>	РЕЗУЛЬТАТ			
	ОП _к			
	ОП _р			
Лептоспира Род. sp.	РЕЗУЛЬТАТ			
	ОП _к			
	ОП _р			
Иерсиния Род. sp.	РЕЗУЛЬТАТ			
	ОП _к			
	ОП _р			
Токсаплазма <i>T. gondii</i>	РЕЗУЛЬТАТ			
	ОП _к			
	ОП _р			
	РЕЗУЛЬТАТ		рр40 175	исп.

Таблица 1

"Поколения" методов выявления основного маркера гепатита В

Поколение	Метод	Относительная чувствительность метода	Количество частиц HBsAg в 1 мл сыворотке крови	Чувствительность (нг/мл)
Первое	Реакция преципитация в геле	1	$1,0 \times 10^{11}$	2000
Второе	Встречный иммуноэлектрофорез	5	$2,0 \times 10^{10}$	400
	Реакция связывания комплемента	10	$1,0 \times 10^{10}$	200
	Реакция обратной пассивной гемагглютинации	100	$1,0 \times 10^9$	20
	Латекс-агглютинация	100	$1,0 \times 10^8$	20
Третье	РИА	4000	$0,5 \times 10^6$	0,05
	ИФА	4000	$0,5 \times 10^6$	0,05



Иммунофлюоресценция — комплекс методов флюоресцентного анализа, применяемых в иммунологии, главным образом в гистохимии, а также в вирусологии, бактериологии, микологии, паразитологии и т. п. Сочетание иммунохимических реакций и флюоресцентной микроскопии позволяет выявлять тканевые и клеточные антигены, в том числе при аутоиммунных заболеваниях и злокачественном перерождении клеток, изучать закономерности синтеза антител и идентифицировать возбудителей многих вирусных и микробных заболеваний.

Популярность реакции иммунофлюоресценции объясняется экономичностью, наличием широкого спектра диагностических наборов, быстротой получения ответа. В настоящее время в этой реакции используют как поликлональные сыворотки, так и моноклональные антитела, меченные флюоресцеина изотиоцианатом. Для уменьшения неспецифического свечения фона применяют обработку мазка бычьим сывороточным альбумином, меченым родамином или голубым Эванса.

Учет результатов реакции осуществляют с помощью люминесцентного микроскопа, в оптическую систему которого устанавливают набор светофильтров, обеспечивающих освещение препарата ультрафиолетовым или синефиолетовым светом с заданной длиной волны. Это заставляет флюорохром светиться в заданном диапазоне спектра. Исследователь оценивает характер свечения, форму, размер объектов и их взаимное расположение.

Наибольшее распространение получили наборы, основанные на прямой реакции иммунофлюоресценции, однако имеются тест-системы, где используется реакция непрямой иммунофлюоресценции.

Основным недостатком реакции иммунофлюоресценции является ее субъективность.

Классическими критериями специфичности этой реакции являются:

- характерная морфология, размеры и расположение возбудителя в мазке;
- периферический характер свечения объекта;
- цвет флюоресценции;
- интенсивность флюоресценции.

.

Мультиплексный иммунный анализ. Методологическое развитие иммуноферментного анализа позволило создать системы, в которых разные виды захваченных молекул-мишеней проецируются в разных точках твердой фазы, что и привело к созданию мультиплексных технологий, позволяющих одновременно определять большое количество (около 100) параметров в одном биологическом образце. В качестве твердой фазы стали использовать не поверхность лунок полистироловых планшетов, а разнообразные дискретные шарики - микрочастицы.

Впервые флуориметрическая технология на шариках была разработана еще в 1977 г. для определения различных антигенов в одном биологическом образце. В настоящее время такую оценку часто используют для определения α -фетопротеина, β_2 -микроглобулина, иммуноглобулинов и иммунных комплексов.

Технология мультиплексного анализа на шариках постоянно совершенствуется. Изначально мультиплексный анализ выполняли в разных сочетаниях.

- В ряде тест-систем один шарик покрывали разными антителами, меченными флюоресцеином.
- В других тест-системах использовали шарики разного размера.
- Шарики могли состоять из различных материалов, таких как латекс, полистирол, полиакриламид, стекло, и соответственно имели разную способность к адсорбции.

В настоящее время распространенными методами мультиплексного анализа являются мультиплексные, в основе которых лежит «сэндвич»-метод — иммуноферментный анализ в разных комбинациях: FAST Quant, Search Light и xMAP. Каждый из этих методов имеет некоторые различия по ряду параметров: определению доступных анализируемых веществ, возможности использования новых аналитов, динамическому ряду оценки, чувствительности метода, стоимости оборудования, цене расходных материалов.

Радиоиммунный анализ — метод количественного определения биологически активных веществ (гормонов, ферментов, лекарственных препаратов и др.) в биологических жидкостях, основанный на конкурентном связывании искомым стабильных и аналогичных им меченных радионуклидом веществ со специфическими связывающими системами. Последними чаще всего являются специфические антитела.

В связи с тем что меченый антиген добавляют в определенном количестве, можно определить часть вещества, которая связалась с антителами, и часть, оставшуюся несвязанной в результате конкуренции с выявляемым немеченым антигеном. Для метки антител или антигенов чаще всего используют изотоп йода ^{125}I , который имеет период полураспада 60 дней и высокую удельную радиоактивность.

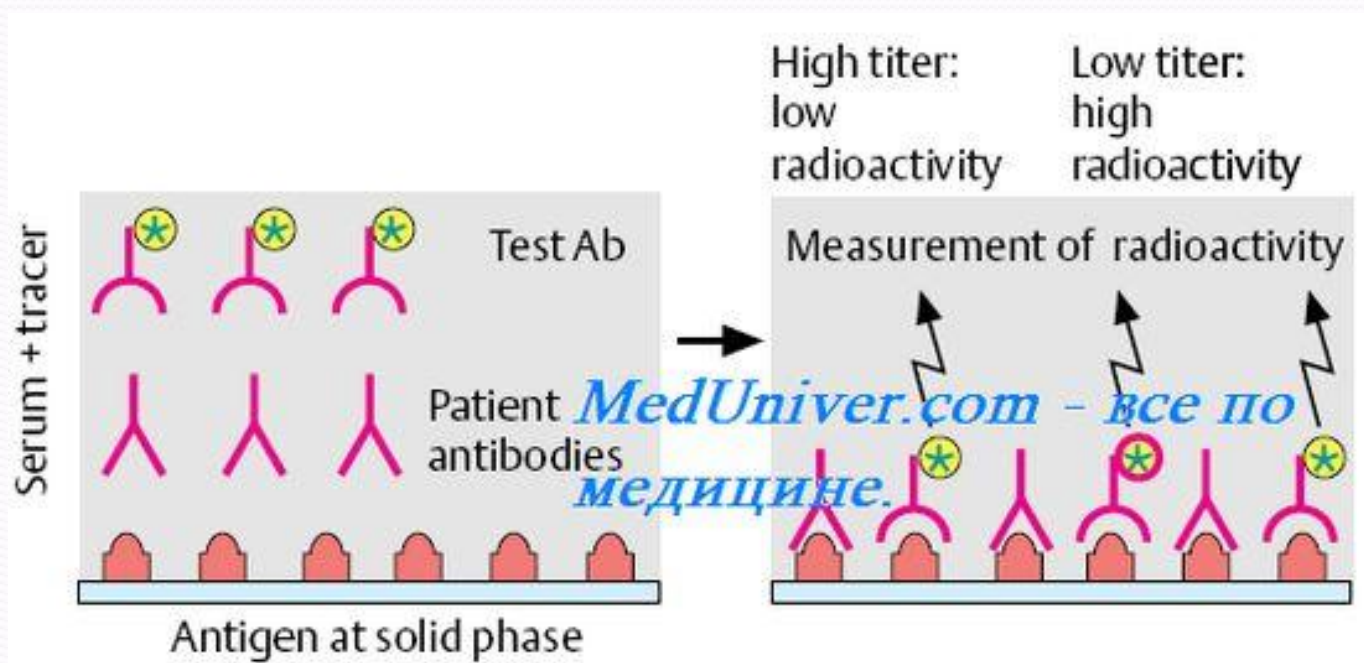
Для радиоиммунного анализа выпускают стандартные наборы реагентов, каждый из которых предназначен для определения концентрации какого-либо одного вещества. Исследование проводят в несколько этапов: смешивают биологический материал с реагентами, инкубируют смесь в течение нескольких часов, разделяют свободное и связанное радиоактивное вещество, осуществляют радиометрию проб, рассчитывают результаты.

Радиоиммунный анализ обладает высокими чувствительностью и специфичностью. Недостатком метода являются ограничения, определяемые режимом работы с радиоактивным материалом, и относительно короткий срок годности диагностического набора, что связано с распадом радиоактивной метки.



Luminex 200

Определение до 100 различных аналитов одновременно в каждом образце,
анализ 96 образцов за 40 минут.



Principle: antibody in patient serum competes with radioactively labeled test antibody

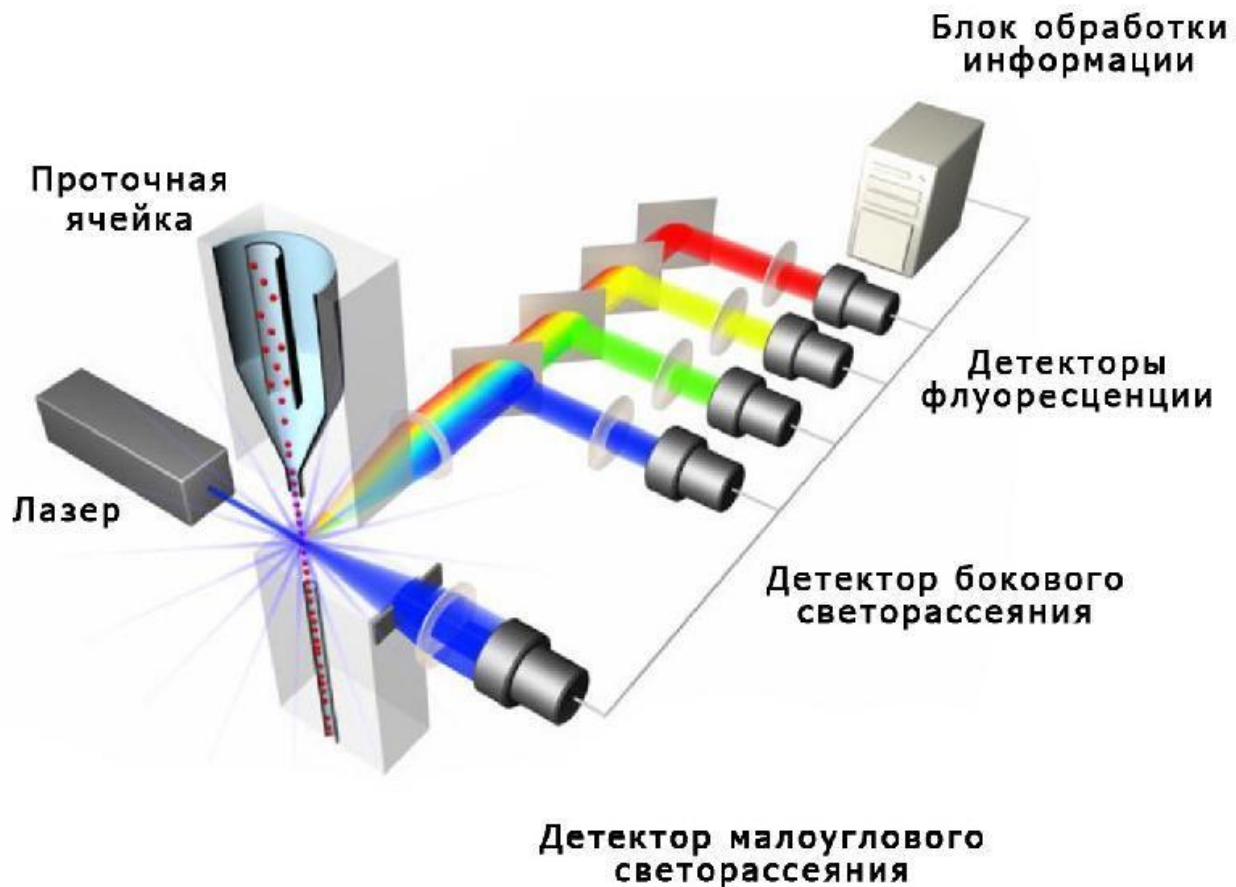
C. Radioimmunoassay (classical method)

Цитометрия проточная — это метод распознавания и подсчета единичных клеток, помеченных флюоресцирующими моноклональными антителами или внутриклеточными антигенами, ассоциированными с клеточным происхождением (например, Т-лимфоцитарное по сравнению с В-лимфоцитарным), клеточной функцией (наличие рецепторов цитокинов или других рецепторов), степенью зрелости (например, пре-В-клетки или зрелые В-клетки).

Проточная цитометрия — метод исследования количества и качества клеток в ходе их перемещения через очень узкий капилляр.

Основа метода заключается в

- 1 использовании системы гидрофокусировки, которая обеспечивает прохождение клеток в потоке поодиночке;
- 2 облучении клетки лазерным излучением;
- 3 регистрации сигналов светорассеяния и флуоресценции от каждой клетки.

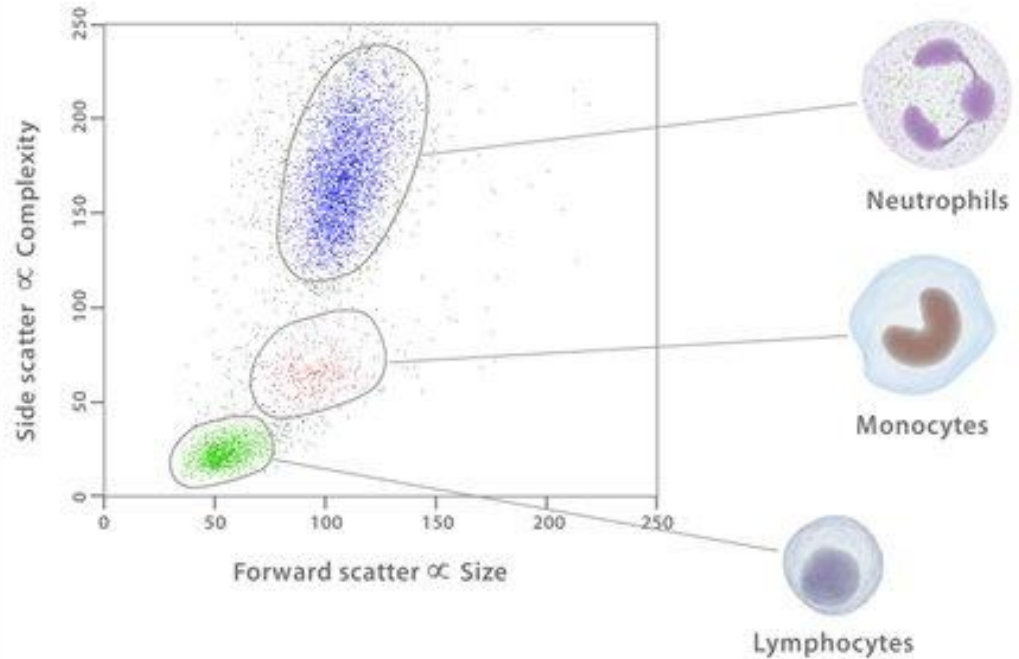




Outline Notes Thumbnails Search

1. Flow Cytometry
2. Definition
3. Instrument Overview
4. Interrogation Point Overview
5. Hydrodynamic Focusing
6. Size Comparison
7. Forward Scatter
8. Forward Scatter Detector
9. Forward Scatter Histogram
10. Overview--Side Scatter
11. Side Scatter Histogram
12. Scatter Plot
13. 2D Scatter Plot of Blood
14. Energy State Diagram
15. Using Fluorescence in Flow Cytometry
16. Fluorescence Detection
17. Fluorescence One Color Histogram
18. Two Color Experiment, Spectra Compatible
19. Two Color Dot Plot
20. Filters Collect Two Colors
21. Emission Filter Types
22. Forward Scatter Threshold
23. Summary

2D Scatter Plot of Blood



Применение проточной цитометрии

Проточная цитометрия применяется для анализа образцов, включая периферическую кровь, аспират костного мозга, с использованием основных видов биопсии, в том числе тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ), биопсии свежей ткани и всех жидкостей организма.

Проточная цитометрия в диагностике, характеристике и мониторинге злокачественных новообразований:

- Дифференциальная диагностика лейкемии миелоидной от лимфоидной при острой и малодифференцированной формах.
- Диагностика иммунодефицитов путем иммунофенотипирования; прогноз.
- Диагностика пароксизмальной ночной гемоглобинурии.
- Проточная цитометрия применяется в контроле за эффективностью терапии.
- Определение минимальной резидуальной болезни в цереброспинальной жидкости или костном мозге.

Проточная цитометрия применяется с целью:

1. Диагностика пароксизмальной ночной гемоглобинурии, миелодисплазии и системных мастоцитозов.
2. Диагностика содержимого ДНК (анеуплоидия) и ДНК-синтезирующей активности опухолей (определение степени злокачественности, например, при раке груди).
3. Проточная цитометрия определяет показатель апоптоза.
4. Определение мультилекарственной устойчивости в химиотерапии рака (например, устойчивость при чрезмерной экспрессии Р-гликопротеина и других белков).
5. Определение перекрестной гистосовместимости для трансплантации органов и стволовых клеток (при трансплантации печени в том числе).
6. Проточная цитометрия используется для определения числа CD34+ - клеток в периферической крови или трансплантате костного мозга, что коррелирует с успехом пересадки и длительностью гематопозитического восстановления после пересадки стволовых клеток.
7. Для определения клеточно связанных антител и сортировки субпопуляций в их составе.

8. Подсчет ретикулоцитов (при анемиях, гиповитаминозах, для определения регенеративной активности трансплантата костного мозга). Также метод используют для определения индекса созревания ретикулоцитов и фракции юных ретикулоцитов (контроль анемий).
9. Определение человеческого лейкоцитарного антигена В27 (HLA-B27).
10. Определение антинейтрофильных антител, связанных с гранулоцитами или расположенных свободно в плазме.
11. Исследование функции нейтрофилов при иммунодефиците (например, фагоцитоз, кислородный взрыв, иммунофенотипирование) и хронической гранулематозной болезни.
12. Митогенстимулированная оценка Т-клеток.
13. Определение функциональной активности тромбоцитов, например, оценка состояния и размещения наружного рецептора в диагностике врожденных функциональных расстройств тромбоцитов (gpIIb/IIIa при тромбастении Гланцманна; gpIb при болезни Бернара — Сулье), показатель тромбоцитассоциированного IgG при иммунной тромбоцитопении и др.
14. Исследование выживаемости эритроцитов с использованием эритроцитов, меченных биотином вместо хрома-51.
15. Выявление внутриклеточных паразитов (Babesia, Plasmodium, Trypanosoma) с использованием РНК- и ДНК-связанных флуорохромов, которые связывают паразитов.

В трансфузионной медицине проточная цитометрия используется для

- Определение и подсчет низкого уровня иммуноглобулинов, связанных с эритроцитами и не определяемых прямым антиглобулиновым тестом (прямая проба Кумбса) у пациентов с гемолизом.
- Определение эритроцитарного химеризма.
- Точное фенотипирование эритроцитов после многочисленных трансфузий.
- Перекрестное взаимодействие с тромбоцитами.
- Определение комбинации лейкоцитов в продуктах крови.

Цитометрия применяется при трансплантации:

- Трансплантация стволовых клеток: соответствие числа CD34 у доноров или реципиентов.
- Определение аллоантител к HLA при трансплантации органов.

В микробиологии цитометрия применяется для:

- выявления специфических антител;
- определения присутствия гетерогенных популяций с разной чувствительностью к антибиотикам.

Молекулярно-генетические методы

Знание структуры и функции генов, основных видов изменчивости, знакомство с наследственными болезнями позволяет перейти к анализу молекулярно-генетических методов.

Методы молекулярной генетики направлены на изучение молекулы ДНК как в норме, так и при ее повреждении, а также на «манипуляции» с молекулами ДНК и РНК.

Использование молекулярно-генетических методов требует знания основных этапов получения определенных последовательностей (фрагментов) ДНК.

Этапы получения последовательностей нуклеотидов ДНК:

1. Получение образцов ДНК:

- выделение всей (геномной) ДНК из клеток (лимфоцитов, фибробластов, амниотических клеток, клеток хориона);
- рестрикция ДНК — получение отдельных фрагментов ДНК (использование рестриктаз, которые разрывают ДНК по строго определенным последовательностям нуклеотидов из 4-6 пар оснований — сайтах рестрикции).

2. Амплификация — накопление (умножение, клонирование) одинаковых фрагментов ДНК:

- использование классических трудоемких методов: создание рекомбинантных плазмид → введение их в бактериальную клетку → размножение клеток → выделение заданных фрагментов ДНК;
- использование полимеразной цепной реакции: разделение двухцепочечной ДНК на одноцепочечную → присоединение праймеров (затравка) к одноцепочечным молекулам ДНК (по принципу комплементарности) → синтез многочисленных полинуклеотидных цепей на одноцепочечных молекулах в границах присоединения праймеров.

3. Электрофорез фрагментов ДНК — разделение фрагментов по молекулярной массе и электрическому заряду на поверхности агарозного геля. Каждый фрагмент имеет определенные размеры и занимает в геле определенное место в виде дискретной полосы.

4. Идентификация конкретных фрагментов ДНК с помощью блот-гибридизации по Саузерну. Фрагменты ДНК переносятся на специальные фильтры, где проводится их гибридизация с радиоактивными синтетическими зондами или клонированными фрагментами ДНК. Зонд выявляет необходимый фрагмент ДНК путем связывания с комплементарными ему нуклеотидными последовательностями фрагмента.

Изменение положения и длины фрагмента по сравнению с контролем (зондом), исчезновение или появление нового фрагмента свидетельствует о перестройках последовательности нуклеотидов в исследуемом гене.

Базируясь на технологии получения нуклеотидных последовательностей ДНК, можно выделить следующие методы молекулярной генетики.

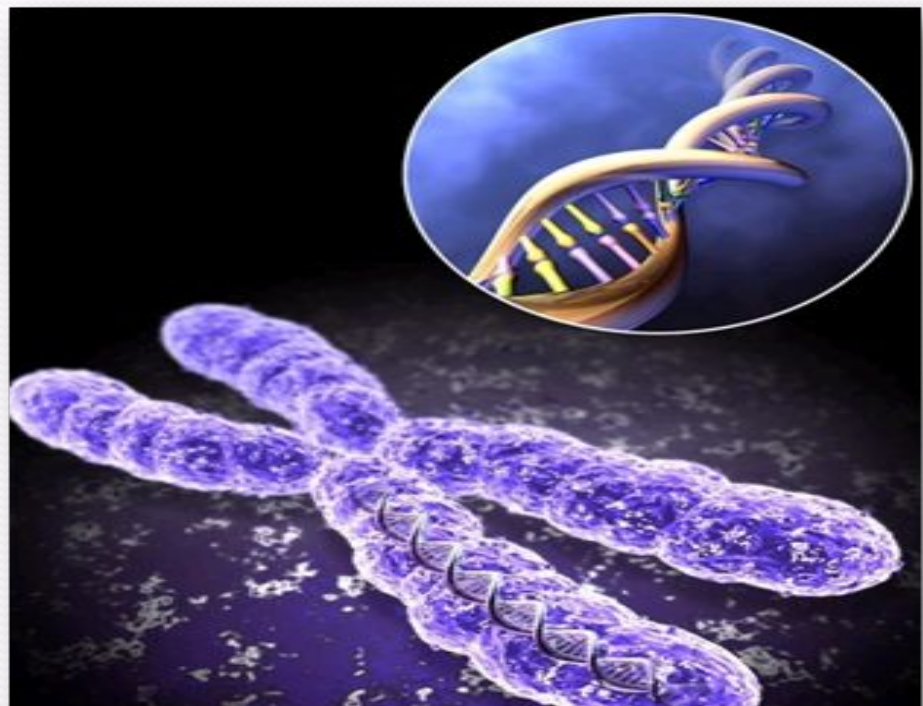
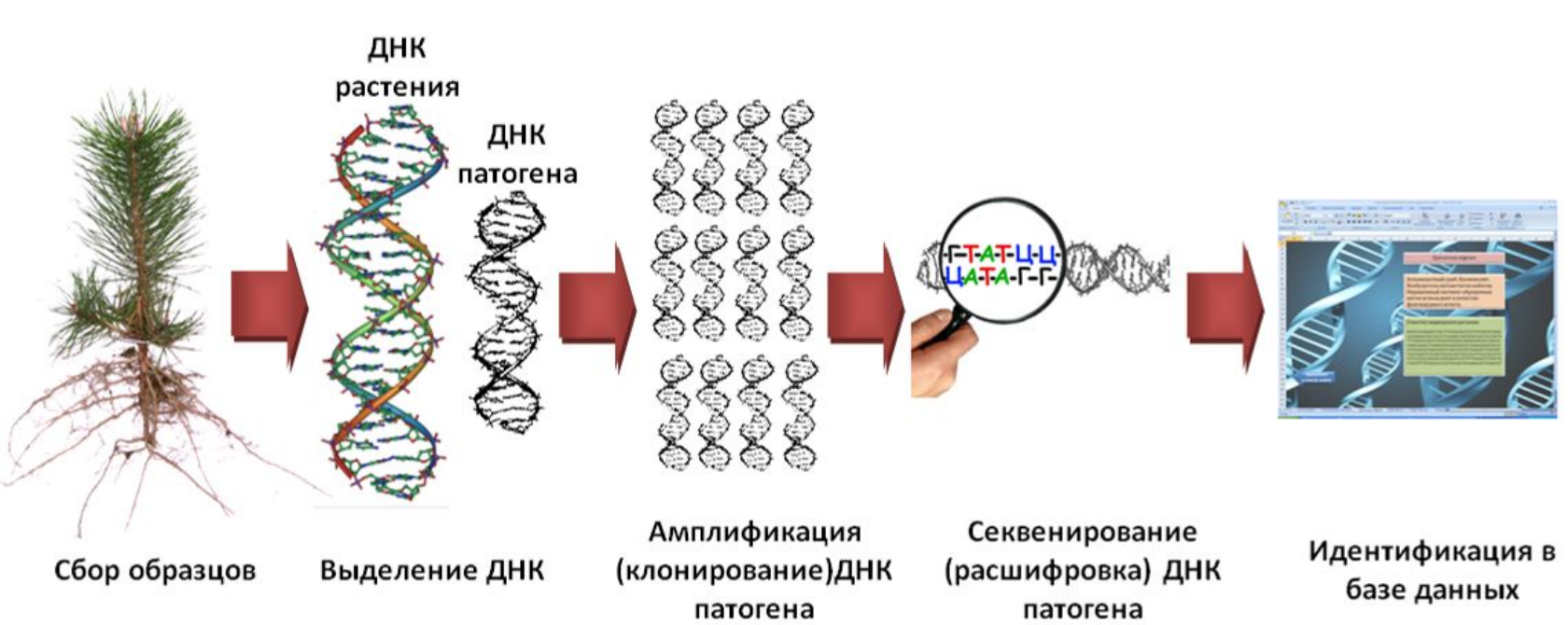
1. Метод секвенирования — определение нуклеотидной последовательности ДНК. Таким методом полностью определена последовательность нуклеотидов генов глобина, некоторых гормонов (инсулина, гормона роста, пролактина и др.).
2. Метод полимеразной цепной реакции (используется для увеличения числа фрагментов ДНК).
3. Метод получения праймеров, соответствующих известным генам.
4. Метод гибридизации нуклеиновых кислот.
5. Метод клонирования ДНК.
6. Метод получения рекомбинантных молекул ДНК.
7. Метод получения белков с помощью рекомбинантных молекул ДНК.
8. Создание библиотеки генов — полного набора (коллекции) клонированных фрагментов ДНК, полученных в результате рестрикции тотальной ДНК.

является диагностика серповидно-клеточной анемии в эмбриональном периоде. Фрагменты ДНК, полученные при действии рестриктаз у здорового и больного, сравниваются с помощью метода гибридизации по Саузерну, при этом в качестве зонда используется радиоактивно меченая ДНК гена Р-глобина;

- диагностировать моногенное наследственное заболевание путем определения нуклеотидной последовательности генов (гемофилия, гемоглобинопатия) и выявления мутантных генов (фенилкетонурия, муковисцидоз);
- осуществлять генетический анализ полиморфизма ДНК родителей и детей;
- определять индивидуальную изменчивость ДНК человека по переменным точкам ДНК, молекулярный анализ которых позволяет проводить идентификацию личности человека);
- выделять и синтезировать гены (выделение, синтез и клонирование генов является одним из этапов генной инженерии):

а) выделение генов: получение определенных фрагментов ДНК с помощью рестриктаз: разделение фрагментов по молекулярной массе и электрическому заряду —» определение длины фрагмента —> выявление нуклеотидной последовательности данного гена;

б) синтез генов (варианты): химический синтез — синтез определенных последовательностей нуклеотидов, соответствующих данному гену (используют генетический код и по известной последовательности аминокислот химическим путем синтезируют последовательность ДНК). Ферментативный синтез — с помощью фермента обратной транс -



Строение хромосом



Хромосома - (от греч. *chroma* — цвет, краска + *soma* - тело) - комплекс одной молекулы ДНК с белками.

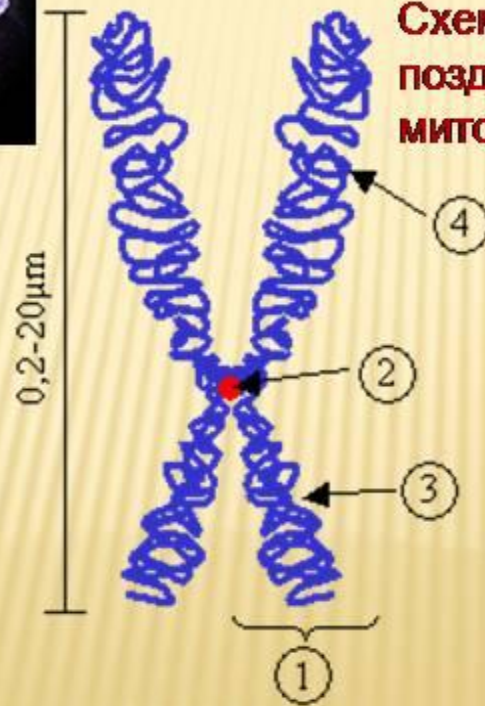
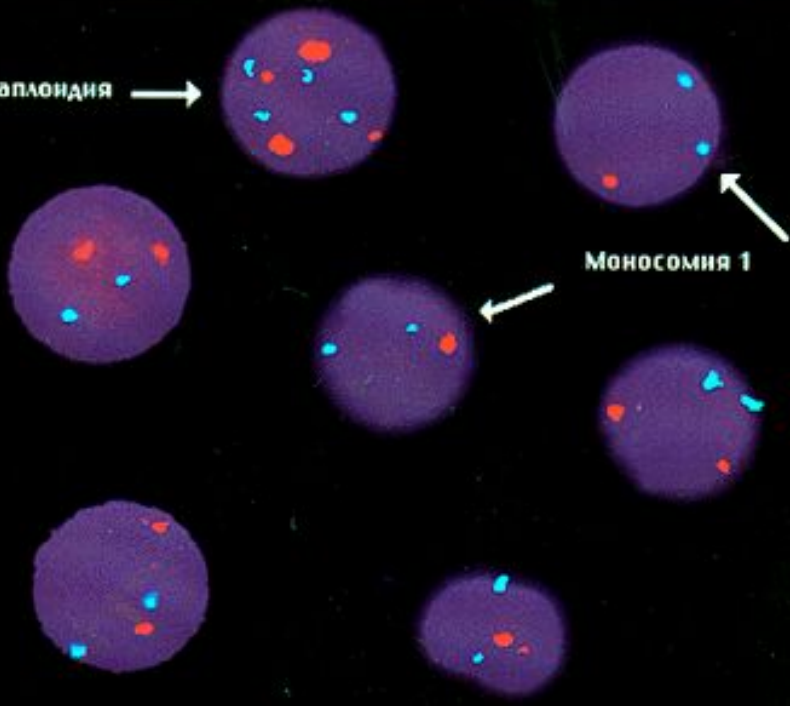


Схема строения хромосомы в поздней профазе - метафазе митоза:

- 1 - хроматида;
- 2 - центромера;
- 3 - короткое плечо;
- 4 - длинное плечо

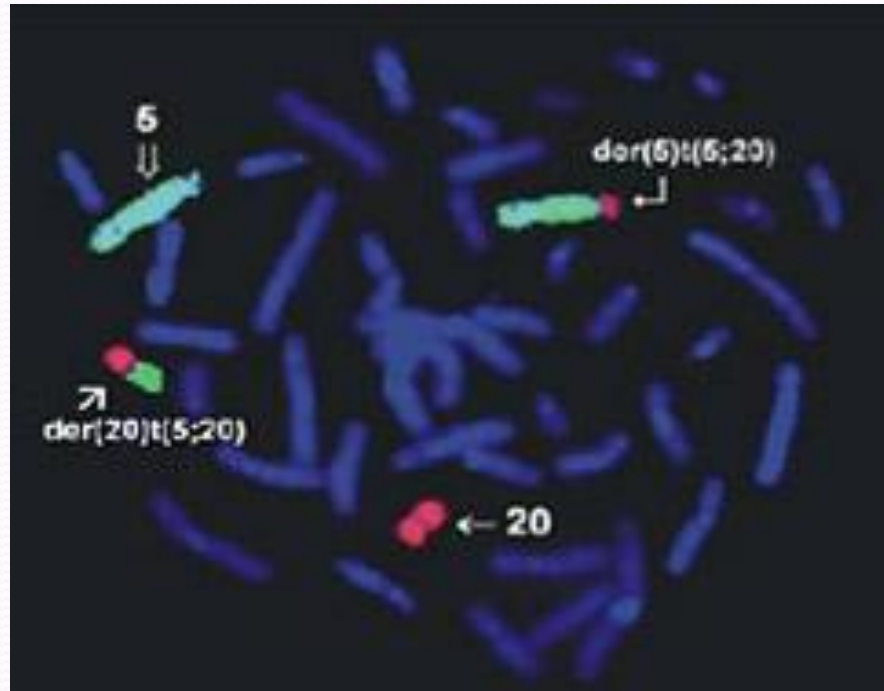


Тетраплоидия →



5
↓
der(5)t(5;20)
↗
der(20)t(5;20)
← 20

This karyotype shows a reciprocal translocation between chromosomes 5 and 20. The normal chromosomes 5 and 20 are shown in green and red, respectively. The derivative chromosomes are labeled as der(5)t(5;20) and der(20)t(5;20). Arrows indicate the specific bands on the chromosomes.



MedUniver.com
Все по медицине...



Индивид	Последовательность
1	A G A G T T C T G C T C G
2	A G G G T T A T G C G C G
1	C G T T C G G G A A T C C
2	C G T T A G G A A A T C T
1	T C T T T G A C G A C T C
2	T C T T A G A G G A C T C

Рис. 8.1

Примеры однонуклеотидного полиморфизма у двух индивидов.
 На рисунке приведены три фрагмента ДНК двух индивидов; выделены
 однонуклеотидные различия в геномных последовательностях

Схема выполнения PGD:

Генетическое обследование
супружеской пары

Генетическое
заключение

Оплодотворение *in vitro*
(IVF или ICSI)



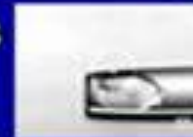
Диагностика
бластомеров методами:
FISH



PCR



Биопсия бластомеров
и/или полярных
телец



Перенос эмбрионов
- не более двух



4 день



5 день



Медицинский алгоритм — в клинической медицине пошаговый протокол для решения задач врачебной практики

Может быть представлен в виде пошаговой инструкции либо блок-схемы алгоритма

Часто такие алгоритмы применяются для решения задач диагностики или скрининга.

Медицинские алгоритмы являются одним из ключевых форматов представления медицинской информации. Медицинские алгоритмы являются одним из ключевых форматов представления медицинской информации.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛГОРИТМОВ ОЦЕНКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Большое значение в оценке результатов лабораторных исследований имеет использование различных алгоритмов. Их применение особенно оправдано при оценке больших комплексов лабораторных анализов.

Диагностические алгоритмы бывают двух типов:

- алгоритмы, используемые для диагностики и дифференциальной диагностики заболеваний;
- алгоритмы, применяемые лабораторией для решения задач, поставленных клиницистом (например, клиницист просит установить причину гипокоагуляции у пациента или выяснить, нарушены ли функции симпато-адреналовой системы).

Основные разделы клинической лабораторной диагностики:

- общеклинические исследования
- лабораторная гематология
- лабораторная коагулология
- клиническая биохимия
- клиническая микробиология и вирусология
- клиническая иммунология
- серология
- токсикология
- цитология
- паразитология
- лабораторный мониторинг лекарственных препаратов
- молекулярные исследования
- лабораторная генетика
- бактериология
- микология

- Диапазоны референтных величин - статистические величины 95% популяции, отклонения за пределы диапазона не обязательно свидетельствуют о наличии патологии. Результаты анализа могут уложиться в пределы референтных величин, но будут выше базовых цифр (нормальных величин) для конкретного пациента, поэтому в некоторых случаях необходимо проводить серию анализов, чтобы получить представление относительно имеющихся результатов.
- Диагноз никогда не ставят по одному результату исследования, необходимо установить тенденцию изменения полученных результатов. Отклонения сразу в нескольких показателях всегда более достоверны и значимы, чем отклонение только одного показателя. Если отклонения в двух или трех тестах характерны для определенной патологии, это с большей вероятностью подтверждает диагноз, чем отклонение только одного показателя.
- Чем больше степень отклонения результата от референтной величины, тем выше достоверность наличия патологии, или это свидетельствует о том, что патология весьма значительна.
- **Правило Остера: если больной моложе 60 лет, то постарайтесь объяснить патологические результаты одной причиной, если это не удастся, то ищите вторую причину.**
- **Патологические результаты необходимо повторить, чтобы подтвердить их и определить тенденцию их изменений.**
- Результаты лабораторных анализов, полученные даже в самых лучших лабораториях, нельзя считать абсолютными. Исследования не обладают 100%-ной чувствительностью, специфичностью и предсказательной ценностью, поэтому в любом конкретном случае результаты могут ввести клинициста в заблуждение.

Риск развития сердечно-сосудистых заболеваний

Показатель крови
Холестерин
Триглицериды
ЛПВП
ЛПНП
АЛТ
АСТ
ЛДГ
Креатинкиназа
МВ-фракция креатинкиназы
Протромбин
Фибриноген
С-реактивный белок
Миоглобин (диагностика инфаркта миокарда)

Печеночный профиль

Показатель крови
ГГТП
Билирубин общий
Билирубин прямой
Общий белок
АЛТ
АСТ
ЛДГ
Щелочная фосфатаза
Холинэстераза
Протромбин
Тимоловая проба

Почечный профиль

Показатель крови
Общеклинический анализ мочи
Анализ мочи по Нечипоренко
Креатинин
Мочевина
Кальций

Количество инсулина в крови	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Содержание глюкозы в крови	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Диабетическая кома			
Частотный диурез	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Лейкоцитоз	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
СОЭ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ЦК			
Гематокрит (повышение)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Концентрация глюкозы в крови	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Содержание кетоновых тел	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Смоляриность крови	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Электролиты крови (снижение количества хлора, натрия, калия)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Кислотно-основное состояние крови (снижение pH, ацидоз, бикарбонаты)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Возрастные шлаки (гиперазотемия)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Содержание мочевины в крови (повышение)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Содержание лактатов в крови (повышение)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Диабетическая нефропатия (исследования не реже 1 раз в 4–6 мес)			
Микроальбуминурия			
Белок в моче (протеинурия)			
Исследование суточной мочи (скорость нарастания протеинурии)			
Проба Реберга (клиренс креатинина)			
Гиперкреатининемия			
Гипоальбуминемия			

Антинуклеарные антитела

Анти-ДНК

Общий белок

Белковые фракции

Диабетический профиль

Показатель крови

Глюкоза

Фруктозамин

Гликозилированный гемоглобин

С-пептид

Инсулин

Диагностика анемий

Показатель крови

Железо сыворотки крови

ЖСС

Ферритин

Трансферин

В-12

Фолиевая кислота

Эритропоэтин

Клинический анализ крови с морфологией эритроцитов
--

TORCH-инфекции

Показатель крови

Антитела к возбудителю токсоплазмоза

№	Этапы иммунного ответа	Лабораторные показатели, позволяющие оценить активность компонентов иммунной системы
8	Активность гуморального иммунного ответа	В-лимфоциты (CD20); иммунные В-лимфоциты CD5, IgD+; активированные В-лимфоциты (CD23); иммуноглобулины IgA, IgG IgM, IgE; специфические антитела; IL2, IL4, IL10
9	Стимуляция и запуск клеточного иммунного ответа	Т-хелперы 1 (CD45Ra); активированные Т-хелперы (CD4/69); IL2, IL4, IL12, гамма-IFN, IL1
10	Активность клеточного иммунного ответа	Т-лимфоциты (CD3); натуральные киллеры (CD16, CD56); Т-лимфоциты супрессоры/цитотоксические (CD8/69); Т гзт (кожная проба)
11	Общее состояние иммунной системы: (нормо-, гипо-, гипер-активность)	Регуляторный индекс Тх/Тс; индекс соотношения Тх1/Тх2; уровень IL2, IL4, гамма-IFN