

**Современные  
биохимические и  
иммунологические методы  
исследования в медицине**

# Основные биохимические исследования

- Аланинаминотрансфераза (АЛТ)
- Альбумин
- Амилаза
- Аполипопротеин-А
- Аполипопротеин-В
- Аспаратаминотрансфераза (АСТ)
- Белковые фракции
- Бикарбонаты (р СО<sub>2</sub>)
- Билирубин непрямой
- Билирубин общий
- Билирубин прямой
- Витамин В<sub>12</sub>
- Гликозилированный гемоглобин А<sub>1с</sub>
- γ-Глутамилтранспептидаза (ГГТП)
- Глюкоза крови
- Глюкозотолерантный тест (ГТТ)
- Гомоцистеин
- Железо
- Исследование газового состава крови
- Калий
- Кальций
- Кальций ионизированный
- Кальций мочи
- Кислая фосфатаза (КФ)
- Кислотно-основной состав крови (КОС)
- Клиренс эндогенного креатинина

# Основные биохимические исследования

- Креатинин
  - Креатинфосфатаза
  - Креатинфосфокиназа МВ-фракция (КФК - МВ)
  - Креатинфосфатаза (КФК)
  - Лактатдегидрогеназа
  - Лептин
  - Магний
  - Миоглобин
  - Мочевая кислота
  - Мочевина
  - Натрий
- Общий анализ мочи (биохимическое + микроскопическое исследование)
    - Общий белок
    - Определение катехоламинов и их метаболитов в моче
    - Определение кортикостероидов в моче
    - Определение наркотических веществ в моче
    - Реакция Бенс-Джонса

# Основные биохимические исследования

- С-пептид
- Тимоловая проба
- Трансферрин
- Триглицериды
- Тропонин  
(количественное исследование)
- Ферритин
- Фолиевая кислота
- Фосфор
- Хлориды
- Холестерин
- Холестерин липопротеидов высокой плотности (альфа-липопротеиды) (ХЛВП)
- Холестерин липопротеидов низкой плотности (бета-липопротеиды) (ХЛНП)
- Холестерин липопротеидов очень низкой плотности (пре-бета-липопротеиды)
- Холинэстераза
- Церулоплазмин (медная оксидаза)
- Щелочная фосфатаза (ЩФ)

# БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ

- Для того чтобы результаты биохимического анализа крови были корректными, перед сдачей необходимо полностью **отказаться от пищи начиная с предшествующего вечера (максимум - очень легкий ужин), от приема лекарственных препаратов, воздержаться от интенсивной физической нагрузки и выяснения отношений с окружающими.** Стресс способен исказить результаты биохимии крови.
- **Для определения уровня сахара крови** «после нагрузки», что по-иному называется глюкозотолерантным тестом (ГТТ), исследуемый пациент в течение нескольких дней придерживается своей обычной диеты, но без избытка углеводов и жиров, а за три дня до взятия пробы ему отменяются инъекции глюкозы, кофеина и адреналина.

# Биохимический анализ крови:

- **повышение уровня глюкозы** (нарушение обмена углеводов и свидетельствует развитии сахарного диабета);
- **Повышение в крови уровней ХС, липопротеидов, ТГД** ( нарушение жирового обмена );
- **Изменение концентрации фосфора, кальция** (нарушение минерального обмена, что встречается при заболеваниях почек, рахите, некоторых гормональных нарушениях);
- **Изменение концентрации калия, натрия и хлора** неблагоприятно сказывается на работе внутренних органов, особенно сердца;

# Биохимический анализ крови

- **Снижение белка в крови** встречается при заболеваниях печени, почек, голодании;
- **Повышение таких показателей, как: билирубин, АЛТ, АСТ, ГГТ, щелочная фосфатаза,** свидетельствует о нарушении функции печени;
- **изменение уровня амилазы** - патология поджелудочной железы;
- **Повышение уровня креатинина** характерно для почечной недостаточности;
- Повышение концентрации КФК-МВ, ЛДГ, АСТ указывает на инфаркт миокарда;
- **Острофазовые реакции:** повышение титра серомукоида, гаптоглобина, церулоплазмина, сиаловых кислот, СРБ свидетельствует о воспалении в организме.

# Пример изменений биохимических показатели при заболеваниях поджелудочной железы

- Определение активности *альфа-амилазы* в крови и моче, является важным показателем, но не специфическим для острого панкреатита

Кроме поджелудочной железы, источником амилазы могут быть слюнные железы, легкие, слизистая оболочка кишечника. К заболеваниям, приводящим к повышению активности амилазы в крови, могут относиться, **перфорация пептической язвы, холецистит и аппендицит**. Показано, что только у 1/3 пациентов с острой болью в животе повышение амилазы обусловлено патологией поджелудочной железы.



# Пример изменений биохимических показатели при заболеваниях поджелудочной железы

■ Важным диагностическим тестом в лабораторной диагностике острого панкреатита является определение активности **эластазы в сыворотке крови и кале**. Данный показатель увеличен на протяжении нескольких дней даже после единичного приступа острого панкреатита.

При обострении хронического панкреатита у ряда больных наблюдаются **гипербилирубинемия**, увеличение в сыворотке крови активности **щелочной фосфатазы и ГГТФ** вследствие развития частичной или полной непроходимости желчных путей

# Онкомаркеры.

- В **норме** онкомаркеры вырабатывают клетки эмбриона. **АФП**
- Каждое **злокачественное** или **доброкачественное новообразование** выделяет свой, специфический белок - **антиген рака**. **ХГЧ**  
**ПСА** (онкомаркер простаты)  
**РЭА**
- Выявить **раковые антигены** на ранних стадиях можно, сделав **анализы крови на онкомаркеры**. **СА — 125** (онкомаркер яичников)
- **Онкомаркеры** также дают реальную **возможность** предотвратить развитие онкологии, определив **наличие опухоли** в стадии «ноль». **СА 15—3** (онкомаркер молочной железы)  
**СА 19—9** (онкомаркер поджелудочной железы)

# ДНК-диагностика: ПЦР-анализ

- **ДНК-диагностика** — это один из наиболее современных высокотехнологичных методов исследования. ДНК-анализы широко применяются в **диагностике инфекционных заболеваний, вирусных инфекций, различных мутаций** позволяя обнаруживать даже единичные микроорганизмы в организме человека.
- ДНК-диагностика объединяет несколько методов исследования, самый распространенный из них — **метод ПЦР** (полимеразной цепной реакции).

# Что такое ПЦР

- **ПЦР метод** — (Polymerase chain reaction, PCR diagnostics) - это метод лабораторной диагностики инфекционных заболеваний, в частности, этот метод широко применяется и для диагностики **ЗППП** — заболеваний, передающихся половым путем.
- **ПЦР основан** на обнаружении в материале исследования небольшого фрагмента ДНК возбудителя той инфекции, которую подозревает врач. «Небольшой фрагмент ДНК» — это несколько сотен пар оснований ДНК — кирпичиков, расположенных в строго определенной последовательности, и потому образующих неповторимый узор.

# Что такое ПЦР

- Сама **полимеразная цепная реакция (ПЦР-диагностика)** используется для того, чтобы найденный фрагмент размножить, клонировать: чтобы однозначно «увидеть» эти фрагменты ДНК, к окончанию реакции их должно быть не менее  $10^{12}$  штук.
- **При проведении ПЦР-анализа ведется поиск** такого фрагмента ДНК инфекции, который специфичен только для данного микроорганизма. Это значит, что этот фрагмент ДНК «особенный» — он встречается только у этого микроба (или группы родственных микробов), но не встречается ни у одного другого микроба.

# История открытия ДНК и разработки метода ПЦР

- Первоначально сам принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) был разработан **Кэрри Мюллісом** в 1983г. и за разработку ПЦР-анализа Кэрри Мюлліс уже в 1993 г. был удостоен Нобелевской премии в области химии.
- Появлению метода проведения полимеразной цепной реакции **предшествовали определенные достижения молекулярной генетики**: к тому времени уже были расшифрованы нуклеотидной последовательности геномов ряда микроорганизмов и выделены специфические.

# История открытия ДНК и разработки метода ПЦР

- Также появлению ПЦР способствовало открытие уникального фермента ДНК-полимеразы (или *taq*-полимеразы). Именно этот фермент катализирует и «контролирует» все процессы во время проведения анализа методом ПЦР. Особенность этого фермента — он термостабилен, исключительно термостоек: он выдерживает нагревание до температуры кипения без потери активности, а «любимый» его температурный режим во время работы — 72°C. Многие реакции при проведении ПЦР идут почти исключительно при повышенной температуре.

# Материал для сдачи ПЦР-анализа

- соскоб эпителиальных клеток (соскоб из **уретры** у мужчин и у женщин, соскоб из **цервикального канала**)
- **кровь**, плазма, сыворотка крови
- биологические жидкости (**сок простаты**, плевральная, спинномозговая, околоплодная, суставная жидкости, слюна)
- **моча** (используется первая порция утренней мочи)
- мокрота
- биопаты **желудка** и **ДПК**
- **слизь** и другие биологические выделения





# Применение ПЦР

## Криминалистика

- ПЦР используют для сравнения так называемых **«генетических отпечатков пальцев»**. Необходим образец генетического материала с места преступления — кровь, слюна, сперма, волосы и т. п. Его сравнивают с генетическим материалом подозреваемого. Достаточно совсем малого количества ДНК, теоретически — одной копии. ДНК расщепляют на фрагменты, затем амплифицируют с помощью ПЦР. Фрагменты разделяют с помощью электрофореза ДНК. Полученную картину и называют *генетическим отпечатком пальцев* (англ. *genetic fingerprint*).

# Применение ПЦР

## Установление отцовства

Хотя «генетически отпечатки пальцев» уникальны (за исключением случая однойяцевых близнецов), родственные связи все же можно установить, сделав несколько таких отпечатков (рис. 3). Тот же метод можно применить, слегка модифицировав его, для установления эволюционного родства среди организмов.



Результаты электрофореза ДНК-фрагментов, амплифицированных с помощью ПЦР.

(1) Отец. (2) Ребенок. (3) Мать. Ребенок унаследовал некоторые особенности генетического отпечатка обоих родителей, что дало новый, уникальный отпечаток

# Применение ПЦР

## Генотипирование:

- Иногда лекарства оказываются токсичными или аллергенными для некоторых пациентов.
- Эти различия детерминируются на генетическом уровне. Например, у одного пациента определен цитохром Эти различия детерминируются на генетическом уровне. Например, у одного пациента определен цитохром (белок печени, отвечающий за метаболизм чужеродных веществ) может быть более активен, у другого — менее. Для того, чтобы определить, какой разновидностью цитохрома обладает данный пациент, предложено проводить ПЦР-анализ перед применением лекарства. Такой анализ называют предварительным генотипированием Эти различия детерминируются на

# Применение ПЦР

- **Клонирование генов** — это процесс выделения генов и, в результате генноинженерных манипуляций, получения большого количества продукта данного гена. ПЦР используется для того, чтобы амплифицировать ген, который затем вставляется в *вектор* — фрагмент ДНК, переносящий чужеродный ген в тот же самый или другой, удобный для выращивания, организм.
- В качестве векторов используют, например, плазмиды или вирусную ДНК. Вставку генов в чужеродный организм обычно используют для получения продукта этого гена — РНК или, чаще всего, белка. Таким образом в промышленных количествах получают многие белки для использования в сельском хозяйстве, медицине и др.

# Достоинства ПЦР

- **Позволяет обнаруживать любые ДНК и РНК**, даже когда бессильны другие методы.
- **Высокая специфичность и чувствительность.** В материале, направленном на исследование, определяется уникальная последовательность нуклеотидов, характерная только для конкретного возбудителя. Таким образом, можно говорить, что специфичность метода достигает 100 процентов



# Достоинства ПЦР

- **Оперативность.** Постановка реакции занимает несколько часов, таким образом, вся диагностика - от момента сдачи материала на анализ до получения результата - отнимает всего один день.
- **При помощи ПЦР определяют возбудителя,** а не реакцию на его внедрение со стороны организма.
- **Оборудование, используемое для ПЦР, стандартно,** оно не зависит от того, что именно и где именно мы ищем.

# Недостатки ПЦР

- В помещении где проводится ПЦР должен быть установлен **фильтр биологической очистки** со степенью 99,9 процента(образец может быть загрязнен - возможно "ложное срабатывание").
- **Может быть отрицательный результат ПЦР при наличии даже явной клинической картины.** Одна из наиболее возможных причин - материал для исследования был взят "не оттуда".
- Образец должен брать **квалифицированный врач**, строго следуя инструкции, которую ему дает лаборатория
- **Оценивать результаты ПЦР должен практический врач**, который лечит конкретного больного.
- **Не всегда положительный ответ ПЦР означает наличие заболевания.** Например, человек пролечился от какого-либо заболевания, но погибший и уже не опасный возбудитель будет еще некоторое время "разбираться на запчасти" защитной системой организма. Если в этот момент сделать ПЦР - результат окажется положительным.

# ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

## ИФА (Enzyme immunoassay)

- Основан на выявлении антигенов и антител, 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.
- Для проведения любого варианта ИФА основой служит определение продуктов ферментативных реакций при исследовании тестируемых образцов в сравнении с негативными и позитивными контролями.



# ИФА

- **Для диагностики заболеваний исследуют три класса иммуноглобулинов: IgM, IgG, IgA.** Благодаря тому, что иммуноглобулины разных классов вырабатываются в определенной последовательности (M, G, A), с помощью ИФА можно диагностировать инфекцию на разных стадиях и отслеживать динамику развития процесса.
- **обнаружение иммуноглобулинов указывает только на наличие антител,** а не на наличие возбудителя, поэтому при диагностике ряда инфекций наиболее информативно сочетание двух и более методов: выявление возбудителя (ПЦР или другие методы) и антител к ним (ИФА).  
С помощью ИФА оценивают наличие первичных (IgM) и вторичных (IgG) антител к микробному или вирусному антигену. Можно диагностировать такие инфекции, как **герпес, цитомегаловирус, гепатиты В и С, токсоплазмоз, хламидиоз, краснуха.**

# Преимущества ИФА:

- возможность использовать минимальные объемы исследуемого материала;
- высокая чувствительность, позволяющая выявлять концентрацию до 0,05 нг/мл. Такая чувствительность метода определяется способностью одной молекулы фермента катализировать превращение большого числа молекул субстрата;
- стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более);
- простотой проведения реакции;
- наличие как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета;
- возможность автоматизации всех этапов реакции
- относительно низкой стоимостью диагностических наборов.

# Как при помощи антигенов и антител выявляют гепатит?

- На специальный иммунологический планшет – пластина из прозрачного пластика с многочисленными лунками фиксируют антигены гепатита. Обычно это делает сам производитель планшетов.
- Затем в лунки добавляют фракцию крови, содержащую иммуноглобулины – среди которых могут оказаться и антитела к гепатиту. Спустя определенное время лунки промывают.
- Если в крови присутствуют антитела к гепатиту, они прочно присоединятся к поверхности лунок. Теперь осталось лишь определить количество связавшихся с антигеном антител.
- Для этого проводят еще одну иммунную реакцию – с другими антителами, для которых антитела человека к гепатиту уже являются антигеном. Обычно это антитела кролика, которые вырабатываются в ответ на введение иммуноглобулина человека, больного гепатитом.

# Диагностика ТОРЧ-инфекций

## I. Прямые методы:

- **цитология (микроскопия) мазка**
- **посев на соответствующую среду** с выделением возбудителя в бактериальной культуре или культуре тканей
- **прямая иммунофлюоресценция - ПИФ** с помощью моноклональных антител
- **иммуноферментный анализ (ИФА)** для выявления возбудителя
- **полимеразная цепная реакция - ПЦР** с обнаружением ДНК или РНК возбудителя.

# Диагностика ТОРЧ-инфекций

- **I I. Косвенные (непрямые) методы** - выявление специфических иммуноглобулинов (антител) различных классов к возбудителю в серологических реакциях:
  - Различные варианты реакции агглютинации (**РГА и т.п.**)
  - **Реакция связывания комплемента (РСК)**
  - Иммуноферментный анализ - ИФА с определением IgM, IgA, IgG.
- Несмотря на то, что **лабораторная диагностика** в своем арсенале имеет множество методов выявления инфекционных заболеваний, ни один тест не является универсальным !!!

# Методы прямого выявления микроорганизмов:

- **Микробиологическое исследование** - выделение самого возбудителя - "золотой стандарт" лабораторной диагностики. Это метод длительный (до 7 дней) и весьма трудоёмкий.
- **Цитологическое исследование** окрашенных мазков отличается низкой чувствительностью и субъективностью оценки результатов (например, диагностировать хламидиоз этим методом удаётся лишь в 10-15% случаев).
- **Иммуноцитологическое исследование** - выявление антигенов возбудителя в мазках с помощью специфических антител (реакция прямой иммунофлюоресценции РИФ). Метод значительно более точный, однако возможно получение так называемых

# Методы прямого выявления микроорганизмов:

- **Молекулярно-биологические методы** - определение специфического участка ДНК/РНК в геноме возбудителя (полимеразная цепная реакция - ПЦР и лигазная цепная реакция - ЛЦР). Метод обладает высочайшей чувствительностью, приравниваясь к "золотому стандарту".
- **Серологическое исследование** - определение антигенов возбудителя ИФА. Преимущество этого метода - возможность идентифицировать не только микроорганизмы, но и их растворённые антигены (в крови, моче, отделяемом урогенитального тракта). ИФА - точный, автоматизированный метод. Время проведения анализа - 4-6 часов.

■